الكيمياء السريّريّة



تأليف

د. محمد فتحي الهواري

د. فؤاد وهبي عزالدين

تاريخ النشر: ١٩٨٠ بغداد

ويتضمن جدولي (2) ، (3) بعض القيم الطبيعية لعدد من المكونات البيولوجية في الدم ومصل او بلازما الدم وكذلك في بول وبراز الانسان الطبيعي .

جدول رقم (1) : القيم الطبيعية المحسوبة لعدد من المكونات البيولوجية في دم ، مصل ، بلازما الدم في الانسان

المكون البيولوجي	الوحدات	القيمة
الصوديوم Sodium	مللي مكافيء/لتر	(149 - 136)*
البوتاسيوم Potassium	مللي مكافيء/لتر	(5.2 - 3.8)*
الكلوريد Chloride	مللي مكافيء/لتر	(107 - 100)*
البيكربونات Bicarbonate	مللي مكافيء/لتر	(30 -.24)*
الكالسيوم Calcium	مللي مكافيء/لتر	(5.5 - 4.7)*
المغنسيوم Magnesium	مللي مكافيء/لتر	(1.8 - 1.4)*
الفوسفات الغير العضوي	(فوسفور مللي غرام.	
Inorganic phosphorus	(100) مللي لتر)	(4.2 - 2.8)*
يوريا Urea	(مللي غرام/(100) مللي لتر)	(38 - 14)**
الكلوكوز Clucose	(مللي غرام/(100) مللي لتر)	(100 - 63)*
الكرياتنين Creatinine	(مللي غرام/ (100) مللي لتر)	(1.4 - 0.1)**
البيليروبين Bilirubin	(مللي غرام/(100) مللي لتر)	(0.5 - 0.1)**
الكولسترول Cholestrol	(مللي غرام/(100) مللي لتر)	(280 - 140)**
البروتين الكلي total proteins	غرام/(100) مللي لتر	(7.9 - 6.5)*
الالبيومين Albumin	غرام/(100) مللي لتر	(5.5 - 4.2)*
منشيء الليفين fibrinogen	مللي غرام/(100) مللي لتر	(450 - 150)*
الفوسفات القاعدية	وحدة - ارمسترونج/	
alkaline phosphatase	(100) مللي لتر	(11-4)**
فوسفات الحامض الكلي	وحدة - ارمسترونج/	
total acid phosphatase	(100) مللي لتر	(3.6 - 1.1)**
الاميليز amylase	وحدة سوموجي/(100) مللي لتر	(180 - 80)**

* (normal distribution)

** (lognormal distribution)

جدول رقم (2) القيم السوية او الطبيعية المقدرة

أ - في الدم والمصل والبلازما

المكون البيولوجي	الوحدات	المدى
الفوسفاتيز الحامض الغير ثابت للترترات	وحدة كنج - ارمسترونك (100) ملي لتر	(0.80 - 0)
ترانس أمينزاوكسال اسيتيك - جلوتاميك	وحدة دولية اللتر	(20 - 2)
ترانس امينزبيروفيك - جلوتاميك	وحدة دولية اللتر	(15 - 2)
دي هيدروجينيز لا كتيت	وحدة دولية اللتر	(170 - 50)
دي هيدروجينيز بيتا - هيدروكس بيوتيريت	وحدة دولية اللتر	(100 - 40)
5 - نيوكليوتديز	وحدة دولية اللتر	(17 - 2)
حديد المصل	ميكروغرام (100) ملي لتر	(130 - 110)
قوة الارتباط والسعة الكلية للحديد بالمصل	ميكروغرام (100) ملي لتر	(400 - 250)
حامض اليوريك	ملي غرام (100) ملي لتر	(7 - 2)
الهيموجلوبين	غرام (100) ملي لتر	(14.5 - 13.5)
أس ها	عند (38)ْم	(7.42 - 7.35)
الضغط الجزئي لثاني اوكسيد الكربون (PCO_2) ملم زئبق		(45 - 34)

ب - سائل النخاع الشوكي cerebrospinal fluid

البروتينات	ملي غرام (100) ملي لتر	(45 - 15)
الكلوكوز	ملي غرام (100) ملي لتر	(70 - 50)
الكلوريد	ملي مكافيء/لتر	(126 - 120)

جدول رقم (3) : متوسط المكونات في البول والبراز نموذج (24) ساعة .

أ - في البول (urine)

المكون	الوحدة ملغم/(100) مللتر	الوحدة غرام (24) ساعة
الماء	—	(1500)
اليوريا	(1500)	(25)
النوشادر	(50)	(0.8)
الكرياتينين	(130)	(2)
الاحماض الامينية	(40)	(0.6)
حامض اليوريك	(25)	(0.4)
النيتروجين الكلي	(1000)	(15)
الفوسفات (فوسفور)	(100)	(1.5)
	الوحدة مللي مكافىء/لتر	الوحدة مللي مكافىء/24 ساعة
الصوديوم	(130)	(200)
البوتاسيوم	(45)	(70)
الكالسيوم	(7)	(10)
المغنيسيوم	(10)	(15)
الكلوريد	(140)	(200)

ب - البراز (stools) or (faeces)

	لكل (24) ساعة
الوزن الرطب	(60 - 250) غرام
الوزن الجاف	(10 - 50) غرام
الدهون	أقل من (5) غرام
البروتينات	(1.5) غرام
الفوسفات (الفوسفور)	(0.5) غرام
الصوديوم	(3) مللي مكافيء
البوتاسيوم	(10) مللي مكافيء
الكالسيوم	(30) مللي مكافيء
المغنيسيوم	(10) مللي مكافيء

يفضل التعبير عن التراكيز بالمكونات الآيونية (ionic constituents) في الدم والبول بوحدات الوزن المكافىء ليسهل المقارنة بين التغيرات التي تحدث في كل منها بصورة مباشرة وسريعة وعليه فمن المتبع والمعتاد التعبير عن نتائج الآيونات السالبة (الكلوريد ـ البيكربونات ـ والفوسفات ـ والكبريتات ، البروتينات ـ والآيونات العضوية (organic ions) والآيونات الموجبة (الصوديوم ـ البوتاسيوم ـ الكالسيوم ـ المغنيسيوم) بالمللي المكافىء لتر لتحويل تركيز بوحدات الوزن الى وحدات المللي المكافىء . اللتر يجب اولا ان يعبر عن التركيز المللي غرام . لتر ثم يقسم الرقم الناتج على الوزن المكافىء للآيونات أحادية التكافؤ (مثل الصوديوم والكلوريد) فان الوزن المكافىء هو تقسيم الوزن الذري ، اما بالنسبة للآيونات ثنائية التكافؤ (مثال الكالسيوم والمغنيسيوم ، فان الوزن المكافىء هو نصف الوزن الذري ويمكن التعبير عن العلاقة بالمعادلة :

$$\text{ملي مكافيء لتر} = \frac{\text{ملي غرام (100) ملي لتر} \times (10) \times \text{التكافؤ}}{\text{الوزن الذري}}$$

ولحساب التركيز بالمللي مكافيء/ لتر نقسم التركيز بالمللي غرام او الجرام على المعامل الموضح أمام كل مكون بيولوجي في الجدول التالي :

المكون البيولوجي	المعامل
الصوديوم (مللي غرام/(100) مللي لتر) يقسم على	(2.3)
البوتاسيوم (مللي غرام/(100) مللي لتر) يقسم على	(3.9)
الكالسيوم (مللي غرام/(100) مللي لتر) يقسم على	(2.0)
المغنيسيوم (مللي غرام/(100) مللي لتر) يقسم على	(1.2)
الكلوريد (مللي غرام – كلوريد الصوديوم/(100) مللي لتر) يقسم على	(5.85)
(مللي غرام – كلوريد/(100) مللي لتر) يقسم على	(3.55)
البيكربونات (حجم ثاني اوكسيد الكربون/(100) مللي لتر)	(2.24)
الفوسفات (مللي غرام – فوسفور/(100) مللي لتر)	(1.72)
البروتينات (غرام/(100) مللي لتر)	(0.41)

التغيرات في المكونات البيولوجية في الصحة والمرض

تزداد في كثير من الحالات المرضية وتنخفض احيانا مستويات بعض مكونات الدم وتستعمل هذه التغيرات لاغراض التشخيص (diagnosis) والتكهن بالاتجاه المحتمل ان يتخذه المرض (prognosis) وان الكشف على هذه التغيرات يشكل الجزء الاكبر من الكيمياء السريرية الروتينية في المختبرات . ان مقدار الانحراف عن المدى الطبيعي والذي يبرر تشخيص الحالات المرضية يعتمد اساسا على المعرفة والتأكد من المستوى الطبيعي للمكون الحيوي تحت الدراسة والفحص . وكمثال فان المعدل الطبيعي للكالسيوم بين الاشخاص الاصحاء يندر ان يقع خارج المدى (4.5 – 5.6) مللي مكافىء . اللتر من مصل الدم وبالمثل فان نشاط الانزيم الفوسفاتيز الحامض الغير ثابت للترترات لا يزيد في غالبية الحالات الطبيعية على وحدة واحدة من وحدات كنج ـ ارمسترونج / (100) مللي لتر من مصل الدم . وبذا فان تغير مستوى الكالسيوم عن هذا المدى يشير الى وجود اضطراب في تمثيل الكالسيوم كما وان زيادة نشاط هذا الانزيم الفوسفاتيزي الحامض عن هذا المعدل انما يشير الى وجود اصابة غدة البروستات بالسرطان وذلك على شرط ان يكون نموذج مصل الدم المستخدم صالحا وملائما لاجراء الفحوصات لكل من الكالسيوم والانزيم .

ومن جهة اخرى فان معدل بعض المكونات مثل الكلوكوز واليوريا تختلف اختلافاً كثيرا حتى بالنسبة للشخص الواحد بسبب تأثرهما بعدد من العوامل الغذائية (nutritional) والهرمونية (hormonal) وبالمثل تحدث تذبذبات (fluctuations) بمستويات الكالسيوم والفوسفات الغير عضوية بالمصل . ويوضح جدول رقم (4) بعض التغييرات في عدد من مكونات البلازما في بعض الحالات المرضية عند الانسان .

جدول رقم (4) : التغيرات الشائعة في عدد من مكونات البلازما في بعض الامراض عند الانسان

المكون البيولوجي	الحالة المرضية
الفوسفات الحامضي	مرتفع في سرطان البروستات
الفوسفات القاعدي	مرتفع في امراض العظام – اليرقان الانسدادي – وعند الاطفال عنه عند الكبار .
الاميلز	مرتفع في التهاب البنكرياسي الحاد
البيكربونات	مرتفع في القلاء الايضي (metabolic alkalosis) كما .

	في تضيق البواب (pyloric stenosis) ونفاذ البوتاسيوم (potassium depletion) – وكذلك في هبوط التنفس منخفض في الحماض (مرض السكر هبوط كلوي)
البيليروبين	مرتفع في اليرقان (jaundice)
الكالسيوم	– مرتفع في فرط نشاط الغدة الجنب درقية – الاورام اللحمائية الغازية للعظام – الورام النخاعي (myelomatosis)سرطان الثدي (carcionma of the breast) . – منخفض في التكزز (tetany) – الكساح (rickets) لازالة الجراحية او قطع الغدة الجنب درقية – لين العظام ، سوء الامتصاص – الهبوط الكلوي نقص البروتينات في مصل الدم .
الكوليسترول	– مرتفع في اليرقان الانسدادي – متلازمة الكلية – مرض البول السكري الحمل – الخزب المخاطي (myxoedema) . – منخفض في التسمم الدرقي (thyrotoxicosis) .
الكرياتينين	مرتفع في الهبوط الكلوي
ترانس امينيزاوكسالاسيتيل – جلوتاميك –	مرتفع في احتشاء القلب (cardiac infarction) التهاب الكبد (hepatitis) .
ترنس امينيز بيروفيك – جلوتاميك	– مرتفع في التهاب الكبد
الحديد	– منخفض في فقر الدم العائد الى عوز الحديد (iron deficiency anaemia) – مرتفع في الصباغ الدموي (haem-chromatosis)
دي هيدروجينيز لاكتيت	– مرتفع في احتشاء القلب ، التهاب الكبد
5 – نيوكليوتيديز	– مرتفع في اليرقان الانسدادي
البروتين	– مرتفع في الورام النخاعي – منخفض في متلازمة الكلية ، نقص البروتين الغذائي

اليوريا	- مرتفع في هبوط الكلية والانسداد المعوي (intestinal obstruction) - وهبوط القلب - والقيء الدموي (haematemesis) .
	- منخفض في الحمل وفي حالات نقص البروتين الغذائي
حامض اليوريك	- مرتفع في هبوط الكلية - النقرس

السيطرة على دقة المختبرات

لقد تم اجراء عدة مسوحات (surveys) في السنوات الاخيرة على الدقة المختبرية والاجراء الاعتيادي بهذا الخصوص هو توزيع نماذج من الدم او البلازما المجففة المجمدة (freeze - dried plasma) على عدة مختبرات حيث يقوم كل مختبر على حدة بتقدير مكونات هذه النماذج . في كل مسح من هذه المسوحات لوحظ وجود اختلافات واضحة في القيم التي تم الحصول عليها . ان الاختلافات الكبيرة بين نتائج المستشفيات المختلفة يبرهن على ان كثير من المختبرات السريرية هي اقل دقة مما كان يعتقد . وفي الحقيقة فان نتائجها ليست بالدقة الكافية للغرض المطلوب . ومنذ وجه الاهتمام للسيطرة على الدقة المختبرية فقد تم اعتماد سجلات في عدد من المستشفيات امكن عندها المحافظة على مستوى مقبول شريطة اتخاذ الاحتياطات الملائمة والضرورية في هذا الصدد والتي يمكن تلخيصها فيما يلي :

1- الممارسة المختبرية العامة :

يعلم المحلل الجيد ـ اهمية نتائجه واجراءاته ستستند على ادراكه الجيد وممارساته العلمية الجيدة ـ وعليه فعند التفكير في اتباع طريقة مختبرية جديدة ينصح بضرورة تمضية فترة من ألوقت في اجراء التحليل على محاليل قياسية حتى يمكن تحديد على اي مدى من التراكيز تكون الكثافة الضوئية (optical density) (او اية قياسات اخرى) متناسبة وتعطي خط مستقيم مع التراكيز . وبالاضافة الى ذلك فان مثل هذه التحليلات المتكررة ستظهر مدى توافق النتائج من وجبة (batch) من النماذج الى وجبة اخرى ومن يوم الى آخر . بعدئذ يمكن تحليل عدد من النماذج المأخوذة من اشخاص طبيعين لتحديد المدى الطبيعي باتباع الطريقة الجديدة . في بعض الحالات يوصي باضافة كميات معلومة من المادة تحت الفحص الى نموذج مصل الدم واجراء التحليل وتحتسب نسبة الاسترداد (recovery) لاظهار عدم ضياع كميات ذات قيمة اثناء ترسب البروتينات او في مرحلة اخرى من مراحل الفحص . اخيرا اذا كان الغرض من الطريقة الجديدة هو احلالها محل طريقة مستعملة اصلا في المختبر فمن الضروري اجراء مقارنة دقيقة بين

نتائج الطريقة القديمة والطريقة الجديدة ويكفي اعتيادياً اجراء مجموعة من المقارنات بحدود خمسين الى المائة (several – dozens) . كما يجب استقصاء اسباب الاختلافات الكبيرة ان وجدت . واذا لوحظ ان النتائج الجديدة تختلف كثيراً عن نتائج الطرق القديمة فمن الضروري اشعار منتسبي المستشفى بالتغيير في الطريقة المستخدمة وكذلك بالمدى الطبيعي المعتمد للطريقة الجديدة . وعندما تصبح الطريقة الجديدة روتينية فان المطلب الاساس حينئذ هو المحافظة على الاداء الجيد ومن الاحتياطات الواجب اتباعها هي تجديد المحاليل القياسية من فترة الى اخرى ومقارنة القياس القديم مع القياس الجديد . وان مطابقة النتائج مؤشر جيد على حسن الاداء واحيانا يتطلب التأكد من صحة العمل واعادة الفحص على نموذج نفس اليوم او اليوم التالي ومقارنة النتائج وكلما قل الفرق وقاربت النتائج من التطابق كان ذلك دليلا على حسن الاداء ايضا . ان المحافظة على دقة مقبولة اكثر صعوبة اذا كان التحليل يجري على فترات بعيدة . وقد يساعد على معرفة دقة النتائج هو ادخال نماذج معروفة التركيز مع كل وجبة من النماذج الغير معروفة التركيز . ان هذا يجب ان يتم في تحليلات الانزيمات (مثل الاميليز) وخاصة ان ما يحدد وحدات الانزيم هو فاعلية الانزيم والتي تتأثر بتغير ظروف التحليل حتى ولو كانت بسيطة وكذلك عند وجود آثار قليلة من مثبطات التي تؤثر على نشاط الانزيم .

2- نظام السيطرة النوعية (Quality control system)

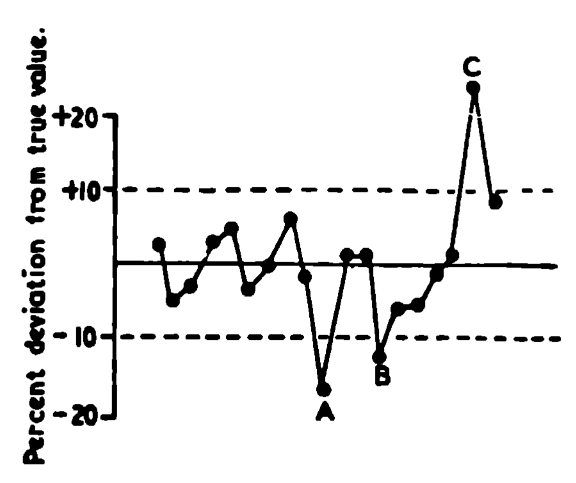
من المعتقد ان نظام السيطرة النوعية الذي تم تطبيقه في عدد من المختبرات قد ساهم مساهمة فعالة وجوهرية في المحافظة على مستوى قياس مقبول . يتم في المختبرات على دفعات (batches) والتي قد تصل الى مرتين او اكثر في اليوم الواحد اعتمادا على عدد الحالات . ويفضل ادخال نموذج السيطرة (control specimen) ذو التركيز المحدد والمعروف مع كل دفعة من التحليلات . ان مقارنة نتيجة نموذج السيطرة مع قيمته الحقيقية يساعد على قبول او رفض نتائج النماذج الغير معروفة التركيز ـ وذلك استنادا على كون الانحراف في نتيجة نموذج السيطرة اقل او اكثر مما هو محدد لطريقة الفحص المتبعة . في الغالبية العظمى للطرق الموصوفة في هذا الكتاب يتم اجراء مقارنة من نوع ما بين النموذج تحت الفحص ومحلول قياس معروف التركيز .

حيث انه من المعتقد ان التحليل الآني (simultaneous) للمحلول القياس المعروف قد يعطي الضمان الكافي ضد الخطأ حيث ان نتيجة المحلول القياسي يمكن في الحقيقة ان يشير الى حدوث خطأ من عدمه . ومن الضروري الاشارة هنا الى انه يلزم معالجة ومعاملة محلول السيطرة القياس تماما بنفس المعاملة التي يعالج بها نموذج الفحص وان يمر بجميع مراحل التحليل . ومن المفيد ان لا يكون المحلل على معرفته بالنتيجة الحقيقية لمحلول السيطرة . ان

هذا لا يعني وجود شك في نزاهة المحلل ، غير ان عدم معرفته بالنتيجة هو الطريق الوحيد لتجنب التحيز اللاشعوري (unconscious bias) والذي قد يؤثر في العمل . ومن السهل تغيير محلول السيطرة مع كل دفعة من النماذج لمنع المحلل من معرفة النتيجة . ويجب ان يتم تشغيل نظام السيطرة لتحديد مجال الخطأ والحيود (variations) التي يتم قبولها ويجب ان لا تكون هذه الحدود ضيقة بحيث يترتب عليها رفض نسبة كبيرة من النتائج كما لا يجب ان تكون واسعة كثيراً حيث ان ذلك قد يحجب بعض الخطأ في النتائج . وفي الواقع فان الغرض التي ستستعمل من اجله النتائج هو الذي يمكن على اساسه تحديد نسبة الخطأ المسموح والذي يمكن ان يتم بالتحليل المتكرر لنموذج او اكثر ومقارنة النتائج التي يتم الحصول عليها . كما يجب التأكيد على احد المؤشرات الذي يعود عليه لتثبيت دقة الطريقة والحدود المسموح بها عند تقدير الصوديوم هو (2±) ، البوتاسيوم (0.2±) ، الكلوريد (2±) مللي مكافىء / اللتر من مصل الدم ونموذج السيطرة . وبالنسبة للبيكربونات (1±) مللي مكافىء ، اليوريا (10%±) والجلوكوز (10%±) من التركيز القياسية وبالمثل للنماذج تحت الفحص .

3-تسجيل النتائج : (recording of results)

من المفيد رسم الخطأ او انحراف نتائج السيطرة على مخطط بياني كما هو موضح في الشكل التالي :



شكل (3) : جزء من مخطط بياني يوضح نسب الانحراف في قيم محاليل السيطرة المستخدمة في تقدير اليوريا .

فاذا كانت الطريقة المستخدمة تؤدي الغرض بصورة جيدة فان نسبة الانحراف والخطأ ستكون ضمن الحدود المسموح بها (10%±) وموزعة بصورة متساوية على جانبي (فوق وتحت)

الخط الذي يمثل القيمة الحقيقية . واذا حدث عند اجراء تحليل لمحلول السيطرة وكانت نسبة الانحراف والخطأ اكثر من المعدل المسموح به فيجب اعادة التحليل فان تكرر الانحراف الكبير دل ذلك على حدوث تلف لاحد المحاليل وعندئذ يجب اعادة تقنين الطريقة بمحاليل جديدة لاستقصاء اسباب ذلك وتصحيح الطريقة . ومن الاسباب التي ادت الى حدوث الاخطاء الموضحة على المنحنى في شكل (3) ما يلي . فعند النقطة (A) تم تغيير مرشح الضوء (light filter) والذي ثبت بالفحص ان نفاذيته الطيفية (spectral transmission) غير صحيحة اما عند النقطة (B) فقد اكتشف ان المحلل الجديد يقوم بتخفيف لون نسلر النهائي (final Nessler colour) الغامق بالماء بدلا من تخفيف نموذج المصل من البداية واعادة الفحص . وعند النقطة (C) وجد ان الاوعية الحاوية على الماء المقطر ملوثة بالنوشادر . وفي الواقع لم يساعد على كشف هذه الاخطاء الا وجود السيطرة والا ما كان ممكنا الكشف على هذه الاخطاء وكان من المحتمل بقاء حدوث الاخطاء لفترة طويلة من الزمن .

استعمال مصول السيطرة (The use of control serum)

لقد حدث اخيرا تطورا هام في مجال الكيمياء السريرية الا وهو انتاج مصول السيطرة سواء في صورة سائل (Liquid) او على هيئة مسحوق مجفف مجمد (freeze – dried) وهذه المصول لها تراكيز محددة بالنسبة لعدد من المكونات البيولوجية ومعدة بصورة خاصة للاستخدام للتحقيق من دقة وصحة التحليلات السريرية الاكثر شيوعا واساس الفكرة هو تجهيز سائل ذو خصائص مقاربة الى المصل الطبيعي او المصل الماخوذ من المريض بحيث يتصرف السائل عند تحليله بصورة تشابه نماذج المصل من الانسان . ويتم تجهيز قائمة بمعدلات المكونات البيولوجية ترفق مع نموذج السيطرة وعلى القائم بالتحليل في المختبر مقارنة النتائج التي يحصل عليها بتطبيق الطرق المستخدمة في المختبر مع تلك بالقائمة المرفقة مع النموذج . واذا اظهرت التحاليل انحراف ذو قيمة عن هذه القيم فيجب البحث وراء الاسباب التي ادت الى ذلك حتى يمكن تفاديها .

ومن الضروري ان يكون للمختبر ثقة بالقيم المثبتة بالقائمة ، وعليه فان الشركات المجهزة تهتم كثيرا للتأكد من صحة القيم المدرجة بالقائمة بالاضافة الى ضرورة الاحتفاظ بالنماذج اثناء الحفظ بدون تغير او فساد . ولذا فان الشركات المجهزة تقوم باعادة التحاليل عدة مرات وبصورة دقيقة على احجام كبيرة من المصول قبل تجزئتها . كما انها ترسل نماذج من كل وجبة إلى عدد من المختبرات المعول عليها قبل التوزيع ، كما انه في بعض الحالات يتم تطبيق كلا الاجرائين لزيادة الدقة والاطمئنان . وهناك طريقة اخرى للتقنية تتخلص في ازالة المكون

الطبيعي في نموذج السيطرة (باستخدام التحال (dialysis) والهضم الانزيمي (enzymatic digestion) واحلاله بكمية موزونة بدقة من المركب النقي ، او عمل مصل تركيبي ، (synthetic serum) عن طريق اذابة كمية من البروتينات والمكونات الاخرى في مذيب مائي ملائم (suitable aqueous solvent) . ومهما تكن طريقة التحضير فان الحفظ يتم بالجمع بين عدد من الخطوات الملائمة كالتعقيم والحرارة المنخفضة والتجفيف والتجمد ، وانه لمن الضروري الالتزام باتباع التعليمات التي يوصي بها المهز لخزن واستخدام النماذج . وهناك رأي بان تستخدم المصول كمحاليل قياسية يتم تحليلها عند اجراء وجبة من النماذج تحت الفحص وتستخدم القراءات التي نحصل عليها من مصل السيطرة لحساب القيم للنماذج المجهولة . ولكن هناك اعتراض قوي اضافة الى الكلفة الزائدة ـ لهذه الطريقة ، بالرغم من ان المصل قد يكون قياس جيد وان القيم المسوبة قد تكون صحيحة ـ غير انه اذا حدث اي خطأ اثناء العمل فليست هناك طريقة لاكتشافه ولذا فمن الافضل استعمال محاليل مائية يتم تحضيرها في المختبر باوزان معروفة من مواد نقية والاحتفاظ بمصل السيطرة لاستعماله كما هو المفروض لنموذج يساعد على التحقيق من صحة ودقة اداء الطرق المختبرية المتبعة في التحليل .

كيفية حساب متوسط القيم والانحراف القياسي
ومعامل الانحراف في عملية التقييم النوعي

mean value متوسط القيم

standard deviation الانحراف القياسي (S.D)

standard error الخطأ القياسي (S.E)

deviation coefficient معامل الانحراف

$$\text{متوسط القيم} = \frac{\text{مجموع القيم}}{\text{عدد القيم}}$$

الانحراف القياسي = الجذر التربيعي لناتج قسمة مجموع
مربعات الفروق بين متوسط القيم
وكل قيمة على عدد القيم ناقص واحد

$$\text{الانحراف القياسي} = \sqrt{\frac{\text{مجموع } (\bar{\text{ك}} - \text{ك})^2}{\text{ع} - ١}}$$

$$\text{الخطأ القياسي} = \frac{\text{الانحراف القياسي}}{\sqrt{\text{ع}}}$$

$$\text{معامل الانحراف} = \frac{\text{الانحراف القياسي}}{\text{متوسط القيم}} \times 100$$

مثال على كيفية حساب ١ – متوسط القيمة .
٢ – الانحراف القياسي ، الخطأ القياسي
٣ – معامل الانحراف .

التجربة : تقدير صوديوم في مصل الدم عند شخص على مدى 31 يوم
وحدة القياس = مللي مكافيء باللتر

تاريخ	القيمة	كَ - ك	^{2}(كَ - ك)
1	129	0.7	0.49
2	129	0.7	0.49
3	130	0.3	0.09
4	130	0.3	0.09
5	130	0.3	0.09
6	129	0.7	0.49
7	129	0.7	0.49
8	132	2.3	5.29
9	130	0.3	0.09
10	130	0.3	0.09
11	130	0.3	0.09
12	130	0.3	0.09
13	131	1.3	1.69
14	131	1.3	1.69
15	128	1.7	2.89
16	129	0.7	0.49
17	129	0.7	0.49
18	130	0.3	0.09
19	128	1.7	2.89
20	130	0.3	0.09
21	130	0.3	0.09
22	130	0.3	0.09
23	130	0.3	0.09
24	130	0.3	0.09
25	130	0.3	0.09
26	131	1.3	1.09
27	129	0.7	0.49
28	128	1.7	2.89
29	132	2.3	5.29
30	128	1.7	2.89
31	130	0.3	0.09
مجموع	4022		31.99

متوسط القيمة كَ = $\frac{\text{مجموع القيم}}{\text{(ع) عدد النماذج}}$

$= \frac{4022}{31}$

$= 129.7$

الانحراف القياسي = $\sqrt{\frac{\text{مجموع (كَ - ك)}^2}{\text{ع - ١}}}$

$= \sqrt{\frac{31.99}{30}}$

$= \sqrt{1.0663}$

$= \pm 1.03$

الخطأ القياسي = $\frac{1.03}{\sqrt{\text{ع}}} = \frac{1.03}{5.57}$

$= 0.18$

معامل الانحراف = $\frac{\text{الانحراف القياسي}}{\text{متوسط القيمة}} \times 100$

$= \frac{100 \times 1.03}{129.7}$

$= 0.8\%$

متوسط القيمة	الانحراف القياسي	معامل الانحراف
كَ = 129.7	= 1.03	0.8%

حيث كَ = متوسط القيمة

ع = عدد النماذج

ك = القيمة

جدول قيم معامل الانحراف المعتمدة

نوع التحليل	معامل الانحراف %
صوديوم	1.6
بوتاسيوم	2.9
كلورايد	2.2
يوريـــا	5.7
سـكر	7.7
كالسيوم	4.0
فوسفات	7.8
حديـد	15.0
حامض البوليك	7.7
كرياتنين	8.9
بيليروبين	19.2
مجموع البروتين	3.9
البومين	7.5
كولسترول	7.6

قياس الضوء الطيفي (Spectrophotometric analysis)

ان كثير من المواد التي لها اهمية حيوية (biological) او طبية (clinical) هي مواد ملونة ، والبعض الاخر منها يمكن يكون مشتقات ملونة coloured derivative والبعض الباقي منها يمكن ان يدخل في تفاعلات كيماوية تؤدي الى انتاج مواد ملونة وان قياس تركيز المواد الملونة في محاليلها يشكل اساسا للتحليل بواسطة قياس اللون (colourimetric analysis) ويمكن بواسطة أجهزة الكهرباء الضوئية الحديثة قياس احدى صفات المحاليل الملونة والتي يطلق عليها الكثافة الضوئية (optical density = O.D or d) والتي تعرف ايضا بـ (Extinction =) (E) ولقد وجد ان اضاءة محلول ملون بضوء احادي اللون (monochromatic light) فان كثافة المحلول الضوئية تتناسب مع تركيز المادة مضروبا في عمق (depth) المحلول المار به الضوء . وعليه فان .

$$d = K \times C \times l$$

حيث (K) = ثابت ، (C) = التركيز ، (l) = عمق المحلول وتعرف هذه العلاقة بقانون لامبرت ـ بير (Lambert & Beer's law) ويستخدم عند مقارنة تركيز محلول غير معروف التركيز مع محلول قياس معلوم التركيز عند اتباع نفس طريقة التقدير والقياس . حيث

(d) للاختبار = (K) × (C) × (الاختبار) × (l)

(I) × (القياس) (C) × (K) = القياس (d)

وبذلك تكون (القياس) (C) × الاختبار (d)

$$\text{للاختبار (C)} = \frac{\text{الاختبار (d)} \times \text{(القياس) (C)}}{\text{(للقياس) (d)}}$$

ويتم الحصول على الكثافات الضوئية للمحاليل بقياس النسبة المئوية من الضوء الساقط التي تنفذ خلال المحلول $d = \log 10(100/T) = 2 - \log T$ حيث (T) هي النسبة المئوية للنفاذ (percent transmission) وعند قياس تركيز مادة ملونة فمن الضروري تهيئة ثلاثة محاليل وهي :-

1 - محلول الفحص والذي قد يكون رشيح الدم أو المصل والخالي من البروتينات (blood or serum free protien filtrate) او اي نموذج آخر يراد تحليله .

2 - محلول قياسي يحضر من كمية معلومة من المادة المراد تقديرها .

3 - محلول كفيء يحتوي على جميع الكواشف عدا المادة تحت الفحص . أن المحلول الكفيء يعادل اي لون غير نوعي (non spcific) ينتج لاسباب مختلفة منها وجود شوائب قليلة في الكواشف وكثير مايكون المحلول الكفيء شفاف عديم اللون مثل الماء وفي هذه الحالة يمكن استخدام الماء بدلاً من المحلول الكفيء .

وحيث ان القياسات المطلوبة هي للضوء النافذ فمن الضروري تجنب اي غيوم (cloudiness) او حدوث عكارة (turbidity) او وجود فقاعات (air bubles) هوائية حيث ان كل ذلك يزيد من الضوء الممتص او المبعثر وبذلك يقلل من كمية الضوء النافذ . ولذا فيجب ان يكون المحلول تحت القياس صافياً بصرياً تماماً وذلك لان الخلية الكهربائية الضوئية (photocell) هي أكثر حساسية من العين بالنسبة للتغيرات الصغيرة في النفاذية وان اهمال هذه الصفة قد يسبب خطأ فادحاً .

طرق قياس الكثافة الضوئية :

تتوفر اجهزة كثيرة والتي يمكن بواسطتها قياس الجزء من الكثافة الضوئية الذي يرجع الى المادة تحت الفحص في المحلول الغير معروف التركيز وكذلك في المحلول القياسي . وان ذلك يتطلب طرح الكثافة الضوئية للمحلول الكفيء من الكثافة الضوئية من هذين المحلولين . وهناك طرق عديدة للوصول الى ذلك غير ان الاجراء البسيط والمعول عليه هو استعمال خلايا زجاجية (cuvettes) والتي يجب ان تكون نظيفة تماماً ولا توجد عليها أية علامات (marks) وخاصة على وجهيها اللتان يمر من خلالها الضوء .

ويستخدم خليتين زجاجيتين ، احدهما تسمى خلية المراجعة وتحتوي دائماً على ماء فقط لضبط الجهاز على الصفر (كثافة ضوئية = صفر اي يعادل نفاذ (100%) .

والخلية الزجاجية الاخرى تعرف بالخلية العاملة (working cuvette) حيث يتم وضع محاليل الكفيء . القياس والفحص لقراءة كثافتها الضوئية ويتم بعد ذلك طرح الكثافة الضوئية للمحلول الكفيء من تلك المحاليل الفحص والقياس . ومن الضروري مراجعة ضبط الصفر على الجهاز اثناء العمل لتصحيح اي انحراف في الجهاز (instrument drift) ومن الاهمية الاشارة الى انه عند مصادفة محاليل فحص لها الوان اكثر شدة من اعلى التركيزات التي تقع على الخط المستقيم (linear part) للمدى العامل ((working range) فأنه يجب تخفيف النموذج من البداية واعادة الفحص من جديد . ومن غير المقبول اطلاقاً تخفيف المحلول الملون النهائي (final coloured solution) لانه قد يكون هناك تحميل مفرط (over loading) لاحد الكواشف .

الكثافة الضوئية وطول الموجة :

لكي تكون العلاقة بين التركيز والكثافة الضوئية علاقة خطية مستقيمة (Linear-relationship) فمن الضروري ان يكون الضوء المستخدم احادي اللون (Monochromatic Light) كما انه يمكن تحديد طول الموجة للضوء المستخدم حسب نوع الجهاز وذلك اما باستخدام واختيار مرشح ضوئي ملون (Cloured Light Filters) معين او يضبط جهاز وحيد اللونية (Monochromatic light) وفي جميع الحالات فغالباً مايكون طول الموجة المناسب هو الضوء الذي يتم امتصاصه بصورة قوية من قبل المحلول الملون . واذا كان الجهاز المتوفر من النوع المستخدم في قياس الضوء الطيفي (spectrophotometer) فعندئذ يمكن تعيين وتحديد الموجه المناسبة وهي تلك التي تكون عندها الكثافة الضوئية اعلى مايمكن . اما في الاجهزة الاخرى فيمكن تعيين الكثافة الضوئية لمحلول مع جميع المرشحات الضوئية المتوفرة واختيار المرشح الذي يعطي اعلى كثافة ضوئية . وعادة مايكون المرشح ذو لون مكمل (complementary light) للون المحلول .

فالمحلول الازرق مع مرشح احمر ، والمحلول الاخضر او البني مع مرشح ازرق ، والمحلول الاحمر مع مرشح اخضر .

ويجب استخدام تراكيز للمحاليل بحيث تكون قراءات الكثافة الضوئية في المدى (0.8–0.2) كذلك من الضروري معرفة المدى الذي تكون فيه الكثافة الضوئية متناسبة طردياً وتماماً مع التراكيز . ويمكن تحديد ذلك بتحضير سلسلة من المحاليل القياسية التي تعطي كثافة

ضوئية من الصفر (اي محلول كفيء) الى (0.8) الى (1.0) ثم رسم خط يوضح العلاقة بين الكثافة الضوئية والتركيز وان الجزء المستقيم من الخط يوضح المدى الذي تعمل فيه الطريقة بصورة صحيحة وجيدة اما اذا لم يعثر على علاقة خطية مستقيمة فيجب اعادة التجربة عند طول موجي آخر . ان ايجاد الكثافة الضوئية لمحلول السيطرة القياسي مع كل وجبة من النماذج هو المحقق الاكثر فائدة للتأكد من ان الطريقة تجري بصورة صحيحة .

ان المنحني القياسي (standard curve) والذي يبين العلاقة بين الكثافة الضوئية وتركيز المحلول يمكن استخدامه لمعرفة تركيز محلول مجهول بعد تقدير كثافته الضوئية ولكن من الافضل دائماً دمج محلول قياسي مع وجبة نماذج الفحص للتأكد من صحة الطريقة ودقة أدائها وعدم حدوث اخطاء اثناء العمل .

الاجهزة المستخدمة لقياس الكثافة الضوئية

هناك عدة انواع من الاجهزة والتي يمكن وصفها باختصار فيما يلي :-

أ - أجهزة كهربائية ضوئية ذات خلية واحدة :

وهذه الاجهزة بسيطة وتلائم التحليلات الروتينية لقياس اللون . ومصدر الضوء فيها يتألف من خيط تنجستون (tungsten-filamnet) يغذى كهربائياً من بطارية او محلول كهربائي يعطي تيار ذو فولت ثابت لضمان بثات شدة الضوء الناتج .

ويستخدم في هذه الاجهزة مرشح ضوئي ملون (من الزجاج او الجيلاتين) ليسمح بسقوط جزء معين من الضوء ذو طول موجي محدد وحيد اللون تقريباً على الخلية الضوئية .
ويبين الجدول التالي قيمة نفاذية عدد من المرشحات الضوئية الملونة كثيرة الاستعمال في عدد كبير من الاجهزة :-

المرشح الضوئي	لون المرشح	طول موجة الضوء النافذ من المرشح
(Chance OR-2.red)	(أحمر)	(640) مللي ميكرون
(Chance O-Gr-1-green)	(أخضر)	(530) مللي ميكرون
(Chance O-B-2.blue)	(ازرق)	(480) مللي ميكرون
(Ilford 621 violte)	(بنفسجي)	(455) مللي ميكرون
(Ilford 622 blue)	(أزرق)	(465) مللي ميكرون

(Ilford 623 blue-green)	(ازرق – اخضر)	(495) مللي ميكرون
(Ilford 624 green)	(أخضر)	(520) مللي ميكرون
(Ilford 625 yellow-green)	(اخضر – أصفر)	(540) مللي ميكرون
(Ilford 626 yellow)	(أصفر)	(570) مللي ميكرون
(Ilford 607 orange)	(برتقالي)	(600) مللي ميكرون
(Ilforde 608 red)	(احمر)	(700) مللي ميكرون

والخلايا الزجاجية (cuvettes) والتي يتم وضع المحاليل فيها قد تكون خلايا ضوئية بصرية مربعة (square optical cells) او انابيب اختبار مستديرة (round test tubes) والانابيب الاخيرة رخيصة الثمن وقد تستعمل لاجراء التفاعل الكيمياوي ويجب اخذ الحيطة الكافية من ان تكون مصنوعة من زجاج رفيع صافي (clear–thin–glass) وخالية من الخدوش (scratches) والخطوط (striae) . كما يجب اهمال انبوبة تعطي تغيرات ملموسة في القراءة عند تدويرها (rotation) في حامل الانابيب (test tube holder) في الجهاز ولذا يفضل وضع علامة على الانابيب تشير الى الوضع والاتجاه الذي توضع فيه الانبوبة في حامل الانابيب في الجهاز . ان الضوء النافذ من الخلية الزجاجية يقع على السطح الحساس لخلية سيلينيوم ضوئية (selenium photocell) وينتج عن سقوط هذا الضوء تولد تيار كهربائي يتناسب مع شدة الضوء الساقط . وهذه الخلية الضوئية متصلة الى جلفانومتر (galvanometer) مدرج مقياسه او تدريجة (scale) بوحدات الكثافة الضوئية (optical density units) او النفاذية (transmission) او كلاهما . وقبل البدء في قياس الكثافة الضوئية يجب ضبط مقياس الجلفانومتر على الصفر مستخدماً المحلول الكفيء حتى تكون الكثافة الضوئية على المقياس مع المحاليل الملونة متناسبة مع تركيز الالوان بها . ان الاستجابة الطبقية لخليلة السلينيوم تساوي تقريباً العين البشرية ومن ثم فأن هذه الاجهزة يمكن استعمالها فقط في منطقة الطيف المرئي (visible spectrum) اي في المنطقة الطيفية (700–400mu) مللي مايكرون .

ب ـ اجهزة كهربائية ضوئية ذات خليتين :

تحتوي هذه الاجهزة على خليتين كهربائيتين ضوئيتين تعمل احداهما عكس الاخرى (work in opposition) . ان كمية الضوء التي امتصت من قبل محلول ملون والواقعة على احدى الخليتين تعوض (compensated) وتقاس بتغيير كمية الضوء المارة خلال الماء فقط . والتي تقع على الخلية الاخرى ويتم تحديد ذلك بتغيير حجم الفتحة (aperature) التي يدخل منها الضوء ليسقط على الماء حتى يتساوى مع الضوء النافذ من المحلول الملون . ان الخليتين

الضوئيتين موصلتان الى جلفانومتر ويشير تدريجه الى الصفر عندما تتساوى كميتا الضوء الساقطين على الخليتين الضوئيتين نظراً لتساوي كمية التيار الكهربائي الناتج من كلتا الخليتين ولكونها في اتجاهين معاكسين . ان اي تغير في كمية الضوء الواصل الى اي من الخليتين ، سواء نتيجة تغير المحلول الملون أمام احدى الخليتين او لتغير حجم الفتحة أمام الخلية الاخرى سيسبب نشوء جهوداً كهربائية غير متساوية وعليه فأن أبرة القياس الجلفانومتر ستبتعد عن الصفر وعندئذ يجب تعديل وضبط وضع الاسطوانة (drum) الذي يسيطر على اتساع أو لتضيقها حتى يمكن استعادة موازنة الجلفانومتر على الصفر . وبهذه الوسيلة فأن كمية الضوء المرشح الممتص (filtered light obsorbed) من قبل المحلول الملون يمكن قياسها بوحدات لوغارتيمية على تدريج الاسطوانة . ويمكن وصف تشغيل مثل هذه الاجهزة بأختصار كما يلي :-

1) يتم وضع مرشحات الضوء المكملة للون محلول الفحص على جانبي الضوء قبل مروره على الخليتين الضوئيتين .

2) يتم تعديل تدريج الطبلة (drum) او الاسطوانة الى الصفر وهنا يعني بأن الفتحة مفتوحة بالكامل .

3) يتم وضع محلول الفحص الملون الموجود في خلية زجاجية للبلمرة على هذا الجانب .

4) يعدل مقياس الجلفانومتر الى الصفر وذلك بتحريك احكام الحجاب(diaphragm) على الجانب الآخر ، حيث توجد خلية زجاج بها ماء مقطر .

5) يتم الآن تعويض الفحص بالماء او المحلول الكفيء حيث ستقل كمية الضوء الممتص ومن ثم تتحرك نقطة مقياس الجلفانومتر عن الصفر .

6) يتم اعادة الجلفانومتر بالغلق الجزئي للفتحة القابلة للتغير وعندئذ تعطي قراءة الاسطوانة مقياساً لكمية الضوء الذي تم امتصاص بواسطة محلول الفحص الملون .

7) يتم قراءة محلول قياسي بنفس الطريقة .

8) يتم حساب تركيز محلول الفحص بمقارنة قراءته مع قراءة المحلول القياسي معلوم التركيز وطبقاً للمعادلة .

$$(C_{test}) = \frac{(R_{test}) \times (C_{standard})}{(R_{standard})}$$

حيث (R_{test}) = قراءة نموذج الفحص .

$(R_{standard})$ = قراءة المحلول للقياسي .

$(C_{standard})$ = تركيز المحلول القياسي .

(C_{test}) = تركيز نموذج الفحص .

اجهزة قياس الضوء الطيفي ذات الحواجز (Grating – spectrophotometer)

تشابه هذه الاجهزة الى حدٍ كبير مقياسات الكهربائية الضوئية ولكن تختلف عنها في طريقة الحصول على ضوء أحادي اللون ، فبدلاً من أستخدام المرشحات الضوئية يستخدم حاجز انحراف (diffraction-grating) يشتت (disperse) الضوء الابيض الى طيف مستمر (continuouse spectrum) . وبتدوير (rotation) اسطوانة تحمل أطوال الموجات الضوئية يمكن تحريك الحاجز الانحرافي ليسمح للاجزاء مختلفة من الطيف (والتي تحدد اطوال موجاتها على الاسطوانة) بالسقوط على الخلية الضوئية .

أجهزة قياس الضوء الطيفي ذات المنشور الزجاجي

(Glass prism spectrophotometer)

ان استعمال منشور زجاجي لاختيار ضوء احادي اللون يجعل الجهاز أكثر دقة واعلى كلفة وفي مثل الاجهزة يسقط الضوء الناتج من خيط تنجستون (tungston filamnet) على فتحة الدخول (interance slit) ومنها ينفذ ويقع على منشور زجاجي له القدرة على احداث طيف منتشر (extended spectrum) .

وان الكمية الصغيرة المحددة من الضوء (جزء صغير محدد من الطيف المنتشر) يقع على فتحة الخروج (excit slit) وهو وحده الذي يتمكن من العبور خلال الخلية الزجاجية ويسقط على الخلية الضوئية وهذه الخلية الضوئية من النوع المفرغ (vaccuum photocell) الاكثر حساسية من خلايا السيلينيوم وذلك حتى يمكنها ان تظهر تأثير كمية الضوء الصغيرة المحددة التي تقع عليها . كما انه يمكن تضخيم (ampilify) استجابتها بسهولة . ومن المعتاد تجهيز هذا النوع من الاجهزة بنوعين من الخلايا الضوئية : أحداهما حساسة للضوء قصير الموجة (625–360) مللي ميكرون ، بينما تستخدم الاخرى لقياس الضوء طويل الموجة نسبياً (1000–650 mu) مللي مايكرون .

يلاحظ ان مدى أطوال الموجات التي يمكن عنده أخذ القياسات يتضمن الطيف المرئي (750–400) مللي ميكرون ، ويمتد على أحد الجوانب الى منطقة الاشعة فوق البنفسجية (400–360) مللي ميكرون ، وعلى الجانب الآخر الى منطقة الاشعة تحت الحمراء (infrared) (1000–750) مللي ميكرون ، وعليه فيمكن تقدير المواد ملونة في المنطقة المرئية ولكن يمكنها ان تمتص أجزاء من الطيف في المنطقة فوق البنفسجية أو تحت الحمراء .

وفي هذه الاجهزة يتم اخذ القياسات للنفاذ (transmission) لتطبيق الاشارة المكبرة (ampilified signal) من الخلية الضوئية على سلك – منزلق (wire) – (slide) مدور ومدرج

وتحريكه للحصول على توازن (balance) يستدل عليه من قراءة مقياس صغيرة . ويتم عمل الانضباطات (adjustment) بالتتابع مشابهاً تلك التي استعملت في مقياس اللون الكهربائي احادي الخلية . ومع عدم وقوع ضوء على الخلية الضوئية ، يتم تشغيل ضابط التيار المعتم (darck – current) للحصول على الموازنة . وبعد ذلك وعندما تكون خلية المحلول الكفيء في ممر الضوء يتم تغيير حساسية مقياس الضوء الطيفي حتى يتعادل عند (d = o) اي (100% = t) وغالباً مايتم الوصول الى هذه الوظيفية عن طريق مفتاح التحقق (check-switch) والذي يضع بصورة ذاتية (automatically) مقاومة في الدائرة (circuit) مساوية الى السلك – المنزلق عند الوضع (d=o) . وعندئذ نضع الخلية الزجاجية المحتوية على محلول الفحص ويعاد اجراء التوازن باستخدام السلك – المنزلق والذي يعطي الكثافة الضوئية عند حدوث الاتزان .

اجهزة قياس الضوء الطيفي ذات المنشور الكوارتز
(Quartz spectrophotometers)

ان مدى طول الموجة الضوئي المتوفر في الاجهزة ذات المنشور الزجاجي محدد الى درجة ما بسبب عتامة (opacity) المنشور الزجاجي للموجات الضوئية الاقل طولا عن (350 mu) مللي ميكرون . لذا فان استخدام منشور من الكوارتز يساعد على اخذ قياسات عند الطول الموجي الضوئي (220 mu) مللي ميكرون . ويستخدم مع هذه الاجهزة خلايا من الكوارتز (quartz cuvettes) كما يتوفر بها مصدر اضافي للضوء يتكون من مصباح هيدروجيني ذو غلاف من الكوارتز (quartz enveloped hydrogen discharge lamp) وهو مصدر غني للاشعاع فوق البنفسجي والذي يشغل عادة من مصدر قوة منفصل غير المستخدم لبقية الجهاز .

اختيار الجهاز(Selection of apparatus)

ان اجهزة اللون الكهربائية الضوئية احادية او ثنائية الخلية تلائم جميع الطرق المستخدمة والمطبقة في مجال الكيمياء السريرية الروتينية والاعتيادية . ان الدقة الاضافية التي يمكن الحصول عليها في الاجهزة المعقدة الاخرى ليست ذات اهمية كبرى حيث ان الخطأ في النماذج (collection of samples) وفي نقاوة الكيماويات هي العوامل الاساسية التي تسيطر على الدقة النهائية للتحليل . ولكن يفضل استخدام أجهزة الضوء الطيفي عندما تكون الالوان التي تقاس باهتة وضعيفة (كما هو الحال عند تقدير النحاس والحديد في مصل الدم) . كما أنه من الضروري

أستخدام مقياس الضوء الطيفي ذو المنشور من الكوارتز عند استخدام طرق التحليل التي تعتمد على الامتصاص في المنطقة فوق البنفسجية والتي تزداد اهميتها واستعمالاتها يوماً بعد يوم .

وكمثال لذلك عند تقدير فيتامين (أ) ، والباربيتيورات (barbiturates) ، حامض اليوريك باستخدام أنزيم اليوريكيز (uricase) وكذلك عند تقدير نشاط بعض الانزيمات بأستخدام مساعدات الانزيمات (NADH, NAD NADPH, NADP) والتي تنحصر قدرتها على الامتصاص في منطقة الطيف فوق البنفسجي .

التحليل الطيفي (Spectroscopy)

اذا تم معاينة الضوء الابيض بمنظار الطيف (Spectroscope) فأن الجهاز سينشر الضوء طبقاً لطول الموجات المختلفة بواسطة نظام بصري (optical system) بحيث يظهر طيف مرئي (continous visible spectrum) من الازرق (ذو الطول الموجي القصير) الى الاحمر (ذو الطول الموجي الطويل نسبياً) . وعندما يوضع محلول ملون بحيث يعترض مسار الضوء الساقط على فتحة منظار الطيف فأن مظهر (appearance) الطيف سيتغير اذا ماأمتص المحلول الملون جزء من الضوء ذو طول موجي معين ومحدد وبكمية كافية تؤدي الى ظهور أشرطة أمتصاص معتمة (dark absorption bands مكان الموجات الضوئية المتصة من الطيف . وهذه الظاهرة او الصفة (phenomenon) غالباً ماتكون ذات نوعية خاصة (specific) تساعد على التشخيص الايجابي لوجود بعض المواد في نماذج المصل والبول . وكأمثلة ندرج مايلي :-

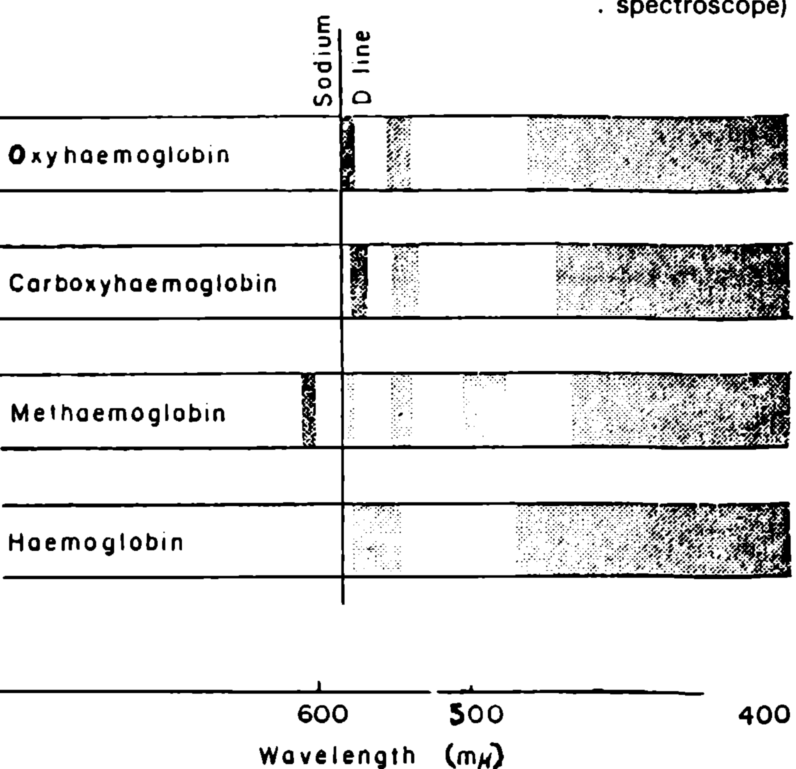
أ - تعطى مادة اوكسهيموجلبين (oxyhaemoglobin) شريطين مميزين احدهما عند (580) والآخر عند (540) مللي مايكرون .

ب - تعطى مادة كاربوكس هيموجلوبين (carboxhaemoglobin) شريطين يشابهان تلك التي تعطيها مادة هيموجلوبين ولكن يمكن التفرقة بين المادتين كما يلي :-

تضاف كمية قليلة من ثنائي ثيونايت الصوديوم ($Na_2S_2O_4$ sodium dithionite) وتذاب بفرق بنموذج الفحص وذلك بقلب (inversion) الانبوب بلطف مع عدم الرج لمنع المزج بكمية كبيرة من الهواء . عندئذ يتغير طيف مادة اوكس هيموجلوبين ويعطي شريط وحيد عند (565 mu) مللي مايكرون (في المنطقة الخضراء) والعائد الى الهيموجلوبين المختزل (Haemoglobin reduced) في حين ان طيف مادة الكربوكس هيموجلوبين لايحدث فيه اي تغير .

جـ - تعطي مادة ميثهيموجلوبين (methhaemoglobin) اربع اشرطة (four-bands) في الطيف وأهم شريط مميز هو ذلك في المنطقة الحمراء عند (633 mu) مللي ميكرون - بالاضافة الى شريطان آخران في الاخضر (580-540 mu) مللي ميكرون والشريط الرابع في منطقة الازرق - المخضر (500 mu) مللي ميكرون (blue-green region) ويمثل

الشكل التالي طيف مادة الهيموجلوبين ومشتقاتها في المنظار الطيفي ذو المنشور (prism spectroscope) .

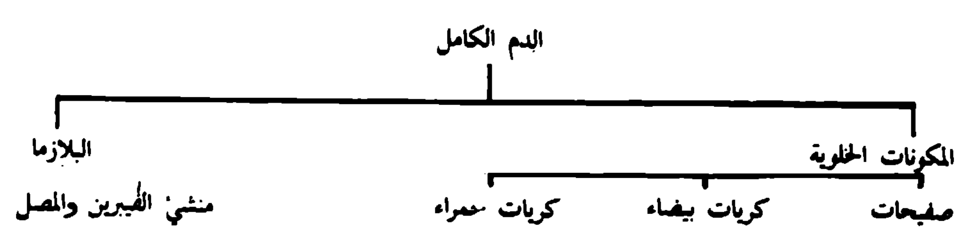


جمع وحفظ نماذج الدم :-

ان التحليل لنماذج السوائل الحيوية (الدم والبول وغيرها) يعتمد على دقة الحصول على النموذج وحفظه بطريقة سليمة لاتؤثر عليه ولا على محتوياته وكذلك تتوقف على التكنيك الدقيق .

وطرق التحليل التي تتم في مختبر الكيمياء السريرية على نماذج من الدم الكامل او المصل او البلازما .

ويمكن توضيح تركيب الدم بالمخطط التالي :-



ويتم اعتيادياً ازالة منشىء الفيبرين بترك نموذج الدم ليتخثر وهناك اربعة احتياطيات او تحفظات عامة يجب ممارستها من قبل الشخص الذي يجمع نماذج من الدم .

1 - يجب ان يكون هناك اقل فترة زمنية لحدوث ركود وريدي حيث ان الركود الطويل ينتج عنه تغيرات كبيرة في قيم عدد من المواد الكيمياوية بالدم .
2 - يجب عدم جمع نماذج الدم اثناء عملية حقن المحاليل عن طريق الوريد حيث ان ذلك يؤثر على المكونات الكيمياوية في الدم .
3 - يجب ان تكون المحاقن التي تستخدم لجمع نماذج الدم نظيفة وجافة والا فان الدم سيحدث به تلوث ويتبع ذلك حدوث انحلال او تحلل (haemolysis) لمكونات الدم .
4 - يجب وضع الدم الذي يتم سحبه في الوعاء المناسب والمعد لغرض الفحص المزمع اجراءه على النموذج .
5 - يفضل في معظم الحالاتان يكون المريض صائماً (fasting) عن الطعام والشراب اثناء ساعات الليل (من 8 مساءاً الى 8 صباحاً تقريباً) .

تأثير الأكل على تركيز بعض مكونات الدم :

هناك معلومات قليلة منشورة في المراجع العلمية فيما يتعلق بتأثير الاكل على المكونات الكيمياوية في الدم . وقد اظهرت دراسة حديثة بان الافطار الاعتيادي ليس له تأثير ملموس على تراكيز بعض مكونات الدم ولذا فليس من الضروري طلب الصيام من المريض عند اجراء الفحص وتشمل هذه المكونات ثاني اوكسيد الكاربون ، الكلوريد ، الصوديوم ، البوتاسيوم ، نتروجين اليوريا ، كرياتينين ، والفوسفور ، والبروتين الكلي بالمصل ، الكالسيوم ، حامض البوليك ، نشاط الانزيم الفوسفاتيز الحامضي والقلوي والانزيمات الناقلة لمجموعة الامين (ترانس امينيزز)(transaminases) والانزيم الساحب للهيدروجين من حامض اللبنيك (Lactic dehyrogenase) والاميليز (amylase) . ومن جهة اخرى فان هذه الدراسة تشير الى تأثير تناول الطعام على تركيز عدد اخر من مكونات الدم مثل الكلوكوز والكولسترول ولذلك فان الصيام ضروري جداً عند جمع نماذج من الدم لتقدير كمية هذه المركبات في الدم .

الاوعية المستخدمة لجمع نماذج الدم ومضادات التخثر :

لغرض الحصول على نماذج من الدم لغرض التحليل في المختبرات الطبية تجمع هذه النماذج في احد الاوعية الثلاثة الاتية والتي قد تكون مستوردة جاهزة او تجهز محليا في المختبر :ـ

1 - عندما يطلب اجراء الفحص او الاختبار على نموذج من الدم او بلازما الدم فيجب جمع

النموذج بانبوب به احدى المواد المانعة للتخثر ، ويعتبر الهيبارين من افضل مضادات التخثر لوجوده بصفة طبيعية في الدم وبذا لا ينتج عن الاستخدام وجود مادة غريبة بالنموذج ولا يسبب تلوث ، ويستخدم الهيبارين (على هيئة هيبارين الصوديوم او الكلسيوم) بتركيز (100) وحده لكل (10) مللي لترات من الدم ، ويستخدم ملح هيبارين الصوديوم في حالة تقدير الكالسيوم بالدم حتى لا يحدث اي تغيير في مستوى الكالسيوم .

ومن المواد الاخرى المانعة للتخثر وشائعة الاستعمال املاح الاوكسالات وخاصة اوكسالات الامونيوم او البوتاسيوم وهي تعمل من خلال ترسيب ايونات الكالسيوم في الدم وبالتالي تؤدي على ايقاف عملية تجلط او تخثر الدم . (ب) مادة (ethylenediamin tetra-acetate EDTA) ، (ج) سترات الصوديوم (sodium citrate) وكلاهما تعمل ايضا على منع تخثر الدم من خلال اتحادها مع ايونات الكالسيوم وبالتالي نوقف عملية التخثر .

2 - عندما يطلب اجراء الفحص على مصل الدم يجمع نموذج الدم في انبوب جاف لا يحتوي على اية مادة مانعة للتخثر ويترك الدم بدون حركة حتى يتخثر وينفصل المصل وللحصول على اكبر كمية من المصل والخالية من اية اثار لكريات الدم الحمراء يوضع الانبوب في جهاز الطرد المركزي (centrifuge) وذلك لمدة 15 دقيقة عند السرعة (3000) في الدقيقة ويفصل ويجمع المصل من على السطح باستخدام ماصة باستير (pasteur pipette) مزودة بحلمة من المطاط(teat–ended) ويوضع المصل في انبوب جاف ويستخدم مباشرة او يحفظ في مجمدة(deep–freeze) لحين الاستخدام وذلك للمحافظة على مكوناته ومنع نمو البكتريا والفطريات(bacteria and fungi) .

3 - عندما يطلب اجراء الفحص على الدم او البلازما او المصل لغرض تقدير مستوى سكر الجلوكوز فيجب ان يحتوي الوعاء الذي سيجمع به نموذج الدم على مادة مانعة للتخثر مثل أوكسالات البوتاسيوم ومادة مانعة لتحلل سكر الجلوكوز(antiglycolytic agent glucolysis) مثل مادة فلوريد الصوديوم (sodium fluoride) تركيز (1) ملجم من كل من اوكسالات البوتاسيوم وفلوريد الصوديوم لكل 1سم من الدم .

تحضير النماذج

ان جمع ومعالجة نماذج الدم لها أهمية كبرى في الكيمياء الحياتية السريرية .
وتجري التحليلات عادة على الدم الوريدي او الشعري . والاخير له منافع كثيرة وخاصة عندما

تكون هناك حاجة لجمع عدد من النماذج وخلال فترة قصيرة ، كما هو الحال عند اجراء فحص تحمل الجلوكوز (glucose tolerance) او دراسة وظائف الكبد والكلية (hepatic and kidey functions) . ويسحب الدم في محقنة (syring) جافة ومعقمة (dry and sterile) (يفضل حالياً المحقنة البلاستيك التي تستخدم لمرة واحدة) ثم ترفع الابرة (needle) ويدفع الدم من المحقن بهدوء وبدون ضغط شديد حتى لا تتكسر كريات الدم الحمراء . وبعض المكونات البيولوجية في الدم تتوزع بالتساوي تقريباً بين كريات الدم والبلازما وذلك مثل الجلوكوز واليوريا ولذا فليس هناك فرق كبير في النتائج التي نحصل عليها من تحليل الدم الكامل (whole blood) او مصل الدم (serum) ولفصل المصل يجمع الدم في وعاء جاف ويترك عند حرارة الغرفة حتى يتخثر وتنحسر الجلطة وينفصل المصل ويجب عدم التبريد لان ذلك يؤدي الى حل الدم وحدوث توزيع غير طبيعي للايونات بين البلازما وخلايا الدم . ويفصل المصل بالسحب بواسطة ماصة باستير (Pasteur pipette) ويعزل منها بالطرد المركزي اية آثار لكريات الدم . ويفضل المصل لمعظم التحليلات السريرية اما البلازما فهي تفضل لتقدير الشوارد والبيكربونات وذلك للاستفادة من الوقت اللازم لفصل المصل من النموذج .

وفيما يلي جدول يبين النموذج المفضل لتقدير عدد من المكونات البيولوجية .

المادة	النموذج	مضاد التخثر	الملاحظات
1) الفوسفاتيز الحامض	بلازما مصل	هيبارين	يفصل بسرعة ويحفظ مجمدا
الفوسفاتيز القاعدي			
الاميليز			
2) باربتيوريت	دم	هيبارين او اوكسالات	يحتاج (10 - 20) سم^3
3) البيكربونات	بلازما	هيبارين الكالسيوم	يجمع تحت زيت ويفصل فورا
4) بيليروبين	بلازما	هيبارين	يجب الا يكون هناك حل للدم
	مصل		ويحفظ بعيدا عن الضوء
5) كالسيوم	مصل		يجمع الدم بدون ركود وريدي
6) كاربوكسي هيموجلوبين	دم	هيبارين	
7) كلوريد	بلازما	هيبارين الكالسيوم	
8) كولسترول	بلازما	هيبارين	
	مصل		

9) كرياتينين	بلازما	هيبارين	
10) منشيْ الليفين	بلازما	اوكسالات	
11) الجلوكوز	دم او بلازما	فلوريد واوكسالات	
12) الترانس امينيزز	بلازما مصل	هيبارين	(يجب الا يكون هناك حل للدم ويحفظ عند 4 مْ)
13) هيموجلوبين	دم	هيبارين او اوكسالات	
14) حديد	مصل		يجمع (5 10) سم^3
15) لاكتيك دبهيدروجينيز	بلازما مصل	هيبارين	(يجب ان لا يكون هناك حل للدم ويحفظ عند 4 مْ
16) مغنسيوم	مصل		
17) (5) نيكليوتيديز	بلازما مصل	هيبارين	
18) أس ها	دم	هيبارين	احفظ بعيدا عن الهواء
19) فوسفات	مصل		افصل بسرعة وحلل فوراً ويجب الا يكون هناك حل للدم)
20) بروتين	مصل		
21) حامض البيروفيك	دم		اجمع الدم مباشرة في حامض ثلاثي كلور الخليك
22) السلسيلات	بلازما مصل	هيبارين	
23) الصوديوم والبوتاسيوم	بلازما مصل	هيبارين الكالسيوم	(يجب الا يكون هناك حل للدم)
24) اليوريا	دم او بلازما	هيبارين	
25) حامض اليوريك	بلازما مصل	هيبارين	

جمع وحفظ نماذج البول

ان جمع الادرار يختلف من حالة الى اخرى وحسب نوعية التحليل المطلوب ويمكن تقسيم نماذج الادرار الى النوعيات التالية :-

1 - نموذج بول الصباح الباكر (early morning) ويجمع النموذج عند الاستيقاظ من النوم وبعد صيام طوال الليل من الساعة 8 مساء الليلة السابقة والى صباح يوم جمع النموذج .

2 - نموذج بول نهاري (day urine) وهو ادرار (12) ساعة تبدأ من الساعة الثامنة صباحاً وحتى الساعة الثامنة مساء من نفس اليوم .

3 - نموذج بولي ليلي (night urine) وهو ادرار (12) ساعة تبدأ من الساعة الثامنة مساء وحتى الساعة الثامنة من صباح اليوم التالي .

4 - بول 24 ساعة (24 hours urine) : وهو ادرار (24) ساعة تبدأ من الساعة الثامنة صباحاً وحتى الساعة الثامنة من صباح اليوم التالي .

5 - نموذج بول لفترة محددة (time urin sample) : وهو الادرار الذي يطرح خلال فترة زمنية معينة يتطلبه الفحص المطلوب وخاصة اختبارات الفحص والتصفية او التنقية (clearance) واختبارات التخفيف او التركيز (dilution or concentratration urine tests) للبول وفي بعض الحالات يطلب الفحص الكيفي او النوعي (qualitative) وليس الفحص الكمي (quantitative) لمتابعة مايطرأ من تغير في تركيب البول من وقت الى آخر اثناء اليوم والذي يمكن ان ينشأ بسبب عدة عوامل منها التغذية ، تناول السوائل واختلاف كميتها - المجهود الجسماني - درجة حرارة الوسط الذي يعيش بها الشخص ... الخ .

اما بالنسبة للتحليل الكمي فكما سبق ان ذكرنا ان تركيب البول يتبدل من وقت الى آخر اثناء اليوم ولذا فمن المتفق عليه ان يكون التحليل الكمي على نموذج بول يوم كامل (24 ساعة) حتى يمكن الاعتماد على النتائج وتزداد صلاحيتها في المساعدة على تشخيص الحالة تشخيصاً دقيقاً .

وفي هذه الحالة يطلب من المريض ان يفرغ البول المجمع في المثانة في الساعة الثامنة صباحاً (تهمل هذه الكمية) ثم يطلب منه ان يجمع كل نماذج البول التي يطرحها بعد ذلك وحتى الساعة الثامنة من صباح اليوم التالي . ومن الضروري التنبيه على المريض انه كلما شعر برغبة في الابراز يلزم جمع نموذج البول قبل التبرز حتى لايفقد اية كمية من البول خلال طوال اليوم .

ومن الجدير بالذكر ان جمع البول لمدة 42 ساعة قد يساعد على حدوث بعض التغيرات به والتي يمكن تلخيصها فيما يلي كما وسنشرح الطرق التي يمكن ان تتبع لتلافي او منع حدوث هذه التغيرات.

التغيرات التي تحدث في نماذج البول عند تركها لفترات طويلة :-

ان اهم التغيرات التي تحدث في نماذج البول التي تترك لفترة طويلة انما يرجع اساساً الى تلوثها ونمو البكتريا بها وان من اهم التغيرات التي تحدث هو من تأثير البكتريا على عدد من المكونات العضوية التي توجد بالبول . ومن أهم هذه المواد نذكر اليوريا والتي تقوم البكتريا بتحويلها الى كربونات الامونيوم ونحن جميعاً نعلم عن تصاعد رائحة الامونيا من نماذج البول المتركة لوقت طويل . ومن ثم فأن نماذج الادرار التي تترك لفترة او لوقت طويل لاتكون صالحة لتقدير اليوريا او النوشادر او أ س ها أو محتواها من النتروجين .

ومن المواد الاخرى التي يتأثر تركيزها عند تلوث البول بالبكتريا نذكر سكر الجلوكوز حيث يمكن للبكتريا ان تستهلك سكر الجلوكوز ومن ثم فأن النتائج عندئذ تحمل كثير من الخطأ .
ومن جهة اخرى فأن نمو البكتريا على البول وتكون كربونات الامونيوم عمل على تحول أ س ها للبول الى الجانب القلوي وهذا يساعد على ترسب املاح الفوسفات كما ان حامض البوليك واملاحه يمكن ان تترسب ايضاً عند انخفاض درجة حرارة البول بتركه في غرفة او مكان بارد . ولذا فأنه يجب قبل أجراء الفحص على نموذج البول ان يتم مزج النموذج جيداً وتدفئته حتى 37م - 45م للعمل على اذابة مايكون قد ترسب من حامض البوليك او املاحه . وفي بعض الحالات ممكن أضافة بعض قطرات من حامض معدني (حامض الهيدروكلوريك) تجعل أس ها على الجانب الحامض والذي يعمل على اذابة ماقد يكون قد ترسب من املاح الفوسفات .
ومن الضروري الاشارة الى ان نماذج البول التي تجمع لفترات قصيرة او لزمن محدد وترسل للمختبرات للفحوص الكيميائية ويمكن جمعها بدون اضافة اي مادة وليس من الضروري جمعها تحت ظروف معقمة (anticeptic) الا في الاحوال التي تتطلب الفحص البكتريولوجي .

حفظ نماذج البول :-

عندما تحفظ نموذج من البول لفترة طويلة او عند جمع البول على فترة زمنية طويلة يجب اخذ الاحتياطات اللازمة لمنع التغيرات التي قد تحدث في تركيب النموذج والتي سبق ان شرحناها اعلاه . وان هذا يتطلب اضافة مادة حافظة (preservative) تعمل على حفظ النموذج وضمان عدم حدوث تغيير بتركيبه ولا يؤثر وجودها بصفة خاصة على المادة المطلوب تقديرها او على التفاعل الذي يستخدم للكشف او لتقدير هذه المادة .

وكقاعدة عامة فان اضافة (10) مللي لتر من حامض الهيدروكلوريك المركز كافية لحفظ ادرار (24) ساعة وان هذا النموذج يكون صالحا لتقدير اليوريا ، النوشادر ، النتروجين الكلي

ولكن من الضروري الاشارة الى ان الكالسيوم والمركبات الاسترويدية مثل (17-) ، كيتواسترويد ، (ketosttroid) وحامض البوليك قد تترسب تحت هذه الظروف ومن ثم فيجب رج ومزج النموذج جيدا وتدفئته قليلا لضمان ذوبان وانتشار هذه المواد قبل البدء في تحليل النموذج .

وفي بعض الحالات يمكن استخدام مواد حافظة اخرى مثل كلوروفورم ، التولين ، النفتا الخفيف (light petroleum) ، الثيمول ، او الفورمالين ولكن هناك بعض المساوىء في استخدام هذه المواد . فان كل من التولين ، النفتا الخفيفة تكون طبقة رفيعة على سطح نموذج البول وهذه تلوث الماصة عند سحب جزء من النموذج وبذا يتأثر الحجم الفعلي للعينة ويمكن التغلب على هذا الصعوبة بوضع نموذج البول في قمع فصل (separating funnel) وتركها ليستقر وتنفصل طبقة التولين وعندئذ يجمع الجزء السفلي والذي يحتوي على البول بدون تولين .

ومن جهة اخرى فان هذه المواد العضوية التي تطفو فوق سطح البول انما تعمل على منع تلوث السطح بالبكتريا من الخارج في حين انها غالبا لا تمنع نمو البكتريا الموجودة داخل النموذج والتي تلوث بها الاخير اثناء الجمع . وان استخدام الكلوروفورم كمادة حافظة يساعد على التغلب على بعض هذه الصعوبات التي تنشأ عند استخدام التولين ولكنها قد تتداخل مع بعض الفحوصات مثل الكشف على وجود الجلوكوز حيث ان الكلورفورم يختزل كل من محلول فهلنج ، محلول بينيدكت وخاصة عند استخدام كمية كبيرة من الكلورفورم بغرض تشبع حجم كبير من البول الذي يجمع خلال 24 ساعة . ويستخدم الثيمول اما على هيئة بلورات او باضافة (5) مللي لتر من محلول تركيز (10%) (وزن/حجم) في كحول الايزوبروبانول (isopropyl alcohol) وقد وجد ان استخدام الثيمول مناسب عند فحص البول بغرض تقدير كمية كل من الصوديوم ، البوتاسيوم ، الكلوريد ، البيكربونات ، الكالسيوم الفوسفور ، اليوريا ، والنوشادر ، الاحماض الامينية ، الكرياتين ، الكرياتنين ، البروتينات ، المواد المختزلة (reducing substances) والاجسام الكيتونية ، نشاط الانزيم الاميلز .

لحفظ البول بغرض تقدير محتواها من حامض الاسكوربيك (فيتامين ج) يمكن استخدام حامض الخليك بتركيز (10%) او حامض الميتافوسفوريك بتركيز (5%) .

وفي جميع الحالات يجب جمع نماذج البول بعناية على ان تؤخذ في الاعتبار نظافة الادوات المستخدمة وحفظ النموذج في مكان بارد مع استخدام الثيمول كمادة حافظة وفي حالات جمع البوا لفترة طويلة يجب جمعه في اوعية تحتوي على مواد حافظة تمنع تكاثر الميكروبات بالنموذج (حيث ان ذلك يؤدي الى تغير تركيب البول) وبالتالي تعمل على المحافظة على تركيز المواد التى قد تتغير كميتها تحت تأثير البكتريا التي تنمو وتتكاثر بالنموذج .

وهناك عدة طرق لحفظ الادرار باستخدام عدد من المواد الحافظة ويتوقف النوع الذي يستخدم من هذه المواد على طبيعة الفحص والتركيب الكيميائي للمادة التي سيتم تقديرها بالبول ، ومن بين هذه المواد يمكن ذكرها ما يلي :-

أ - بعض السوائل والمركبات العضوية :

١ - مذيبات عضوية مثل ، التلوين ، الزيلين (benzene , toluene , xylene ......) والبترول الايثيري وجميعها تطفو فوق سطح البول وتشكل طبقة تمنع من ملامسة اوكسجين الجو بسطح البول وبالتالي تمنع نمو البكتريا الهوائية .

كما ان الرج الشديد من وقت الى اخر يعمل على انتشار دقائق صغيرة من هذه المذيبات في البول وهذه تقلل ان لم تعمل على ايقاف نمو انواع البكتريا الاخرى .

وقبل سحب كمية من البول للفحص يترك الاناء ساكناً وبدون أضطراب (disturbution) لمدة لا تقل عن (30–60) دقيقة للتأكد من انفصال السوائل العضوية الى السطح تماماً ويسحب النموذج بعد ذلك من الطبقة السفلى مثل (lower layer) .

ب - مذيبات الكلورفورم (chloroform)

والذي ينفصل ويتجمع في اسفل الوعاء ولكن بالرج والانتشار فان الكلورفورم يمنع نمو البكتريا على البول المجمع بالوعاء . يمكن التخلص من الكلورفورم بعد ذلك بترك البول ساكنا في قمع فصل ثم تسرب (drained) طبقة الكلورفورم وجزء من الطبقة السفلى من البول ويجري الفحص والاختبار على باقي نموذج البول .

ولكن من الضروري الاشارة الى ان بعض هذه المذيبات يتداخل في الكشف على او تقدير الكمي لبعض مكونات البول . على سبيل المثال فان الكلورفورم يتداخل في تقدير الكلوكوز لانه يختزل محلولي فيهلنج (fehling) ولبينيدكت (Benedic) .

ج - مركبات عضوية مثل الفينول والثيمول

ويمكن اضافة هذه المركبات اما على هيئة بلورات مع الرج في بدء جمع البول او تضاف على هيئة محلول تركيز (10%) في كحول الايزوبروبانول (isopropanol) ويضاف من هذا المحلول (5) مللي لتر في الوعاء الذي سيجمع به بول (24) ساعة مع المزج والرج الجيد مع كميات البول الاولى .

ولقد وجد ان استخدام الثيمول ملائما جدا للحصول على نماذج بول لغرض الفحص لتقدير محتواها من الصوديوم ـ البوتاسيوم ـ الكلوريد ـ البيكربونات ـ الكالسيوم ـ الفسفور ـ اليوريا ـ الامونيا ـ الاحماض الامينية ـ كرياتين ـ الكرياتنين ـ البروتينات ـ المواد المختزلة ـ الاجسام الكيتوتية ـ بعض الانزيمات .

د ـ حامض الخليك :ـ

وجد انه يمكن استخدام حامض الخليك بتركيز (10%) لحفظ بول (24) ساعة لتقدير حامض الاسكوربيك (ascorbic acid = Vit. C) (فيتامين ج) . ويمكن ايضا استخدام حامض الميثافوسفوريك بتركيز (5%) لنفس الغرض .

ملحوظة :

في كثير من الاحوال يمكن بنجاح استخدام نماذج البول التي تجمع خلال 24 ساعة وذلك بحفظها في وعاء نظيف وفي الثلاجة او المجمدة (حسب طبيعة المادة تحت الفحص) وذلك في حالة عدم توفر مادة حافظة يمكن استخدامها لغرض حفظ البول .

حجم البول :ـ

يبلغ متوسط حجم البول اليومي (24) ساعة عند الشخص البالغ (عند تناول الوجبات الغذائية الاعتيادية وكذلك كميات طبيعية من السوائل) يتراوح ما بين (1200–1500) مللي لتر . غير ان كمية البول اليومي قد تختلف اختلافاً تحت عدد من الظروف الفسيولوجية (physiological) او المرضية (pathological) كما انها تتأثر تأثر ملحوظ باختلاف كمية السوائل والطعام التي يتناولها الفرد فان الطعام الغني بالبروتين يزيد من طرح البول وذلك بسبب التأثير المبيل ولزيادة كمية اليوريا التي تنتج وتظهر في الدم . كما ان لتنوع درجة حرارة الجو او الوسط الذي يعمل او يعيش فيه الانسان تعمل على تغير حجم البول اليومي فاذا كانت درجة حرارة الجو عالية في ايام الصيف فان حجم البول ينقص بشكل ملحوظ نظرا لفقدان كمية كبيرة من سوائل الجسم على هيئة عرق (sweat) وبالعكس فأن انخفاض درجة حرارة الجو تعمل على زيادة البول اليومي وهذا مايلاحظه كل فرد في ايام الشتاء القارس ومن جهة اخرى فان القيام بمجهودات عضلية شاقة او تمارين رياضية عنيفة تقلل من حجم البول اليومي وان اقل حجم للبول اليومي واللازم لازالة منتوجات الايض والمواد الغير صالحة فيقدر بنصف لتر للشخص الصحيح البنية .

ومن جهة اخرى تحدث زيادة في حجم البول في عدد من الحالات المرضية ونذكر منها :ـ

ان اكبر حجم للبـول يتم طرحـه في حـالـة البـول التفـه (diabetes incipidus) حيث تتراوح كميـة البول اليومي مـا بين (10–20) لتر وقـد يكون السـبب هو عـدم وجود الهورمـون المضـاد للمبيـل (anit–diuretic hormone) والـذي يفرز بـواسـطـة الفص الامـامي من الغـدة الهيبوثالاماس وهناك حالـة مرضيـة اخرى وهي داء البول الـسكري ويتم طرح بول يومي يصل حجمه من (5–6) لترات يوميا وذلك للعمل على اذابـة كميـات الجلوكوز الكبيرة التي تطرح في البول .

الاواني المختبرية الزجاجية (Laboratory glassware)

يتم صنع الاواني الزجاجية المختبرية عادة من زجـاج السليكابورون . وهـذه المـادة تقـاوم تأثير المواد الكيمياوية (ما عدا حامض الهيدروكلوريـك وحـامض الفوسـفوريـك المركزين والتي قد يمكنها خدش وتآكل هذا النوع من الزجاج .

ومن اهم صفـاتهـا الاخرى هي تحمـل التغير في درجــة الحرارة والكـسر نتيجــة الضربـات الميكانيكية البسيطة .

ومن اجود انواع الزجاج في صنع الاواني المختبرية في الكيميـاء هو نوع بـايركـس (Pyrex) ومونكـس (Monax) تحتوي على كمية منخفضة من الصودا ويمكنها مقاومـة الحرارة والصـدمـات بصورة جيدة .

تنظيف الاواني الزجاجية

ان غسـل الاواني الزجاجية المستخـدمـة بمـاء الصودا وبمـاء الصنبور مبـاشرة بعـد استعمالها يسـاعـد كثيراً على تـسهيل عمليـة التنظيف ويلاحـظ انـه يجب تعقيم الاواني الملوثـة بـالجراثيم في محلول معقم قبل البدء بعمليـة التنظيف ويمكن تلخيص خطوات تنظيف الاواني الزجـاجيـة كما يلي :

1 – اغسـل الاواني الزجاجية جيدا بالماء .

2 – ضع محلول التنظيف ونظف جدران الانبوبة جيدا باستخدام الفرشاة .

3 – اغسـل ثلاث مرات بماء الصنبور ثم ثلاث مرات بالماء المقطر

4 – اطرد الماء الزائد وجفف في فرن كهربائي .

التنظيف الكيمياوي :

نظرا لان التفاعلات والتحولات الكيميائيـة الحيـاتيـة تتـأثر كثيرا بوجود بعض المواد لـذا

يجب تنظيف الادوات الزجاجية المستخدمة تنظيفا كيمياويا ومن افضل محاليل التنظيف التي تستخدم لهذا الغرض محلول ثنائي كرومات البوتاسيوم(potassium dichromate) مع حامض الكبريتيك المركز والذي يحضر طبقا لما يلي :

ثنائي كرومات البوتاسيوم (potassium dichromate; $K_2Cr_2O_7$) (100) غرام

حامض الكبريتيك المركز (250) مللي لتر

اطحن ملح الكرومات الى مسحوق دقيق ثم اضف المسحوق الى (750) مللي لتر من الماء المقطر وحرك جيدا مع اضافة الحامض ببطىء مع التقليب المستمر وحتى يتم ذوبان جميع المسحوق واحفظ في قنينة زجاجية نظيفة ويجب تداول هذا المحلول بحذر وعناية حيث انه يؤثر تأثيرا ضارا على الجلد وانسجة الجسم عند ملامسته اياها .

وبعد الاستعمال المتكرر يتغير لون المحلول من احمر بني الى اللون الاخضر مما يدل على فساد المحلول ويجب ابداله بآخر جديد .

ملاحظة : عدم استعماله في غسل cuvettes بل يغسل بالكحول والماء فقط .

الماصات :

يتم استعمال الماصات لقياس احجام السوائل وحتى (25) مللي لتر ومنها نوعين :

1 - ماصات النقل : تستخدم في قياس حجوم معينة من السوائل وتدرج عادة عند درجة ثابته هي (20C) وهذه الدرجة قريبة جداً من درجة حرارة الغرفة في مختلف المختبرات وهناك نوعين من هذه الماصات :

أ - ماصات ذات بصيلة (bulb - pipettes)

وهي النوع الاكثر استعمالا ودقة في قياس حجوم ثابتة (2,3,4,5,....) ... الخ مللي لتر .

ويجب ان يلاحظ عند استعمالها انه عند توقف سريان السائل منها تمسك الماصة بحيث يلامس طرفها السفلي جدار الوعاء المستقبل لمدة (15) ثانية تقريبا لكي تتجمع آخر كمية من السائل المقاس مع اهمال ما يتبقى بالماصة بعد ذلك لانه يزيد عند الحجم المثبت عليها .

ب - ماصات مدرجة (Graduated pipette)

يفي هذا النوع لاغلب الاستعمالات الاعتيادية عند قياس اجزاء من المللي لتر . ان التدرج الموجود على طول ساق الماصة يسمح بنقل كميات مختلفة من السائل وان الجزء الاقل دقة هو الواقع في الطرف السفلي المدبب ويفضل لذلك استخدام الجزء المدرج من اعلى في قياس الحجوم الصغيرة . وهناك نوعان من الماصات المدرجة :

البعض مدرج الى نهاية الطرف السفلي والاخر ينتهي قبل الطرف السفلي بمسافة مما يقلل الخطأ ويزيد الدقة في القياس .

ماصات محدودة الحجم (Volumetric pipette)

وهذه الماصات ذات حجوم صغيرة (0.005 , 0.01 , 0.05 , 0.1) ... الخ وعند استعمالها يجب غسلها (washing) اكثر من مرة في الانبوب الذي يضاف اليه محتويات هذه الماصات وهناك منها :

أ - نوع ذات بصلة :

وتحتوي على حجم معين ثابت يتراوح بين (0.1–1.0) مللي لتر وهذه تحتاج اليها كثيرا في الطرق الدقيقة لتحليل الدم ويجب غسلها عدة مرات في محتويات الانبوب الذي يضاف اليه الدم .

ب - نوع مدرج الساق :

وهذه تستعمل لقياس احجام صغيرة محدودة تتراوح ما بين (0.02 , 0.05 , 0.1) مللي لتر مثل الماصات التي تستخدم في عد كريات الدم الحمراء والبيضاء والتي تعرف (haemocytometer pipette) .

تحضير المحاليل الحجمية (Preparation of standard volumetric solutions)

اذا كانت المادة الكيميائية المراد تحضير محلولها متوفرة بصورة نقية كيميائيا (chemically analar) فيمكن اخذ وزن معلوم ومعين منها واذابته في الماء المقطر الى حجم معلوم وبذا يكون معروفا تركيزها بالضبط . (exact or accurate).

اما المواد الغير متوفرة بصورة نقية كيميائيا وذلك مثل الاحماض الغير العضوية او المعدنية (inorganic acids) وكذلك القلويات الكاوية (cauatic alkalies) فيحضر منها محاليل ذات تراكيز تقريبية (approximate) ثم يحدد تركيزها بالضبط عن طريق المعايرة باستخدام محلول قياس لمادة نقية . وكمثال فيمكن استخدام محلول قياس من كاربونات الصوديوم اللامائية (anhydrous sodium carbonate) في معايرة محاليل الاحماض ، كما يمكن استخدام محلول حامض السلفاميك (sulphamic acid) في تحديد تركيز القلويات .

وكمثال تتلخص الخطوات العملية لتحضير محلول قياس (normal) (عياري) من حامض الكبريتيك فيما يلي :

1 - يحضر محلول تقريبي ذو تركيز قريب من (N/l) لحامض الكبريتيك وذلك بالاضافة حوالي (60) مللي لتر من حامض الكبريتيك المركز الى حوالي (1000) مللي لتر ماء المقطر ، ثم يبرد المحلول ويكمل الحجم الى (2000) مللي لتر بالماء المقطر مع المزج والخلط الجيد .

2 - المعايرة :

تتوقف احدى طرق المعايرة على استخدام كاربونات الصوديوم المجففة وتعتمد هذه الطريقة على التفاعل التالي:

$$H_2SO_4 + Na_2CO_3 \longrightarrow Na_2SO_4 + CO_2 + H_2O$$

98 gm 106 gm

اي ان (2000) مللي لتر من حامض الكبريتيك العياري تعادل (106) غرام من كاربونات الصوديوم (1000) مللي لتر من حامض الكبريتيك العياري تعادل (53) غرام من كربونات الصوديوم .

اوزن بدقة الكمية المطلوبة من كاربونات الصوديوم المجففة وضعها مباشرة في دورق يحتوي على ماء مقطر وذلك لتجنب التصلب والانسداد الذي يحدث عندما يتم اضافة الماء الى الكربونات في كأس زجاجي ثم محاولة نقلها الى الدورق القياس باستخدام قمع زجاجي .

اذب الملح مستعينا بالتسخين اذا لزم الامر ، ثم برد المحلول الى درجة حرارة الغرفة وحوله الى قارورة قياسية ملائمة ، خفف الى الحجم المحدد ,وأخلط جيدا . حول بماصة (20) مللي لتر من هذا المحلول الى قارورة مخروطية واضف اليه نقطة واحدة من الكاشف (methyl orange) المثيل البرتقالي سحح بمحلول حامض الكبريتيك حتى ظهور اول لون برتقالي وكرر عملية المعايرة مع (20) مللي لتر اخرى من محلول كربونات الصوديوم .

المعامل (م) (co-efficient)

يعرف المعامل بانه النسبة بين التركيز الصحيح المعين لمحلول ما الى التركيز الافتراضي تبعا

للوزن ، فمثلا اذا كان وزن المادة المذابة في لتر من الماء والمزعوم انها تعطي محلول قياسي (N/10) (ولنعتبرها ع) (x) فان المعامل يكون (0.92 = 0.092/0.1) ويستخدم هذا المعامل في تحويل عدد المللي لترات من محلول ذو تركيز (0.092) الى عدد من المللي لترات من محلول عياري وذلك بتطبيق القانون .

$$ع_1 \times ح_1 = ع_2 \times ح_2$$

$$0.1 \times ح_1 = (15 \times 0.092) \text{ (فرضاً)}$$

$$ح_1 = \left(\frac{0.092 \times 15}{0.1} \right) = (13.80) \text{ مللي لتر}$$

(x) في حين انه اثناء المعايرة وجد ان العيارية هي (0.092) بالضبط .

تطبيق لاستخدام المعامل (م)

لنفرض ان (20) مللي لتر من محلول $\frac{ع}{1}$ من كاربونات الصوديوم تعادلت مع (19.4) مللي لتر من محلول حامض الكبريتيك والذي تركيزه التقريبي هو $\frac{ع}{1}$ ايضاً وعليه فأن (19.4) مللي لتر من محلول حامض الكبريتيك $\frac{ع}{1}$ = 20 مللي لتر $\frac{ع}{1}$ كاربونات الصوديوم 1 مللي لتر $\frac{ع}{1}$ حامض الكبريتيك = $\left(\frac{20}{19.4}\right)$ = 1.031 مللي لتر $\frac{ع}{1}$ وعليه فان الحصول على محلول حامض الكبريتيك الذي قوة تركيزه $\frac{ع}{1}$ بالضبط يجب تخفيف كل 1 مللي لتر من محلول الحامض المحضر الى (1.031) مللي لتر باستخدام الماء المقطر .

وبذا فلتحضير محلول قياسي من حامض الكبريتيك خذ حجم معلوم من المحلول التقريبي وليكن (50)مللي لتر وخففه الى (50)×(م) حيث م = (1.031)اي (1.031×50) = (51.55) مللي لتر باستخدام الماء المقطر اي باضافة 1.55مللي لتر من الماء المقطر الى كل (50)مللي لتر من محلول الكبريتيك ذو التركيز القياسي الـ ربي .

تحضير محلول عياري من هيدروكسيد الصوديوم

تحتوي محاليل هيدروكسيد الصوديوم دائما على كمية قليلة من ثاني اوكسيد الكاربون مثبت على هيئة كاربونات . ولتحضير محلول هيدروكسيد الصوديوم والخالي من الكاربونات ، تحضر محلول مشبع من هيدروكسيد الصوديوم (حوالي 75%) ويترك في وعاء مغلق لمدة اربعة وعشرين ساعة على الاقل لتتبلور وتترسب كاربونات الصوديوم . ثم يسحب جزء من المحلول

الرائق العلوي (clear supernatant) ونخففه بالماء الخالي من ثاني اوكسيد الكاربون (ماء مغلي ومبرد في جو خالي من ثاني اوكسيد الكاربون) وغالبا ما تكون نسبة التخفيف 1مللي لتر الى حوالي (20)مللي لتر . ثم نعاير (20)مللي لتر من المحلول المخفف بحامض الكبريتيك ذو العيارية القياسية المضبوطة مستخدما المؤشر فينولفتالين (phenolephthalein).

ومن قراءة السحاحة يمكن حساب عيارية المحلول المخفف بالضبط .

تحضير محاليل المؤشرات : (indicator) الميثيل البرتقالي

(methyl orange)بتركيز (0.1%)مع الماء المقطر وتغير اللون المؤشر هو الاحمر عند أس ها (2.9)والاصفر عند أس ها (4.9).

ب - يحضر محلول فينولفتالين باذابة (0.5)غرام في (50)مللي لتر من الكحول ثم يضاف (50)مللي لتر من الماء المقطر وتغير لون المؤشر هو عديم اللون عند أس ها (8.2)والاحمر عند أس ها (10).

الفصل الثاني

سكر الجلوكوز - الكولسترول - البيليروبين

كلوكوز الدم

هناك عدة طرق لتقدير الجلوكوز في الدم معظمها يعتمد على خاصية الكلوكوز في اختزال عدد من المركبات الغير عضوية مثل (ferricyanide) سيانيد الحديديك وكبريتات النحاس وذلك لاحتوائه على المجموعة الألدهيد ذات القدرة العالية على الاختزال وفيما يلي شرح لبعض النقاط المتعلقة بتمثيل الكلوكوز عند الانسان وشرح مبسط لعدد من الطرق المتبقية .

معلومات عامة : يتم احتياج الكلوكوز لاجل عدد من العمليات الحياتية في الجسم ومن اهمها عمليات الهدم لانتاج الطاقة اللازمة للكائن الحي . ويخزن الكلوكوز بعد تحويله الى كلايكوجين في الكبد والذي يمكن تحويله بدوره مرة اخرى الى كلوكوز في حالة انخفاض مستوى الاخير في الدم . ويرتفع معدل الكلوكوز في الدم في حالة تناول وجبات غذائية وخاصة الغنية منها بالكربوهيدرات . وتتم السيطرة على معدل الكلوكوز في الدم بواسطة عدد من الهرمونات والتي اهمها الانسولين الذي يفرز من خلايا بيتا (B – cells) في البنكرياس وعند انخفاض او قصور انتاج الانسولين يختل تمثيل الكلوكوز ويرتفع مستواه في الدم . ومن بين الهرمونات الاخرى والتي جميعها تعمل على زيادة مستوى الكلوكوز بالدم نذكر :- الكلوكاكون (glucagon) والذي يفرز من خلايا الفا (a – cells) في البنكرياس الكلوكوكورتيكويد (glucocorticiods) والتي تفرز بواسطة قشرة الغدة الكظرية (adrenal glands) ومنها الكورتيزون والهيدروكي كورتيزون وكذلك هرمون الادرينالين ، (nor – adrenaline) واللذان يفرزان من لب الغدة الكظرية (adrenal medulla)وكذلك هرمون محرض قشرة الكظر (trophic – hormone adreno) – cortico) وهرمون النمو (growth hormone) الذي يفرز من الغدة النخامية pituitary gland.

ان كمية سكر الكلوكوز في الدم الصائم تكون بحدود 65–95 مللي غرام / 100 مللي لتر . ونظرا لان الكلوكوز موزع بصورة منتظمة بين الكريات والبلازما . ولذا يمكن اخذ تقديره في كل من الدم الكامل او البلازما او المصل .

وغالباً مايكون الدم الشعيري اكثر ملائمة وذلك لانه تؤخذ عينات من نفس المريض وعلى فترات قصيرة يؤخذ الدم الوريدي من دم الذراع اما الدم الشرياني فيأخذ من قمة اصبع الابهام وتوضع في انابيب صغير تحتوي على مادة فلوريد الصوديوم المضاد لتحلل السكر وكذلك مادة مانعة للتخثر مثل اوكزالات البوتاسيوم .

بعض الطرق المستخدمة لتقدير الجلوكوز في الدم

1- طريقة هاجدرون : Hagedorn method

تتوقف هذه الطريقة على اختزال كمية معلومة من محلول سيانيد حديديك البوتاسيوم القاعدي(potassium ferricyanid) بواسطة كلوكوز الدم بعد ترسيب البروتينات ويتم تقدير سيانيد حديديك البوتاسيوم المتبقي عن طريق اكسدة ايوديد البوتاسيوم وتسحيح اليود المتحرر بواسطة ثيوكبريتات البوتاسيوم .

ويمكن توضيح الخطوات الكيمياوية التي تتم كما يلي :

$K_3(Fe^{+++}(CN)$ + جلوكوز ⟵ $(K_4(Fe^{++}(CN)_6$ + (oxidized glucouse) كلوكوز متأكسد

ان اكسدة الكلوكوز جزئية فقط توجد نسبة ثابتة بين كمية الكلوكوز اللازمة لاختزال كمية معينة من سيانيد حديديك البوتاسيوم . $(2Fe^{+++}(CN)_6 + 2I$ ——— $2Fe^{++}(CN)_6 + I_2)$ والكمية الباقية من سيانيد حديديك البوتاسيوم تؤكسد كمية من ايوديد البوتاسيوم لتحرر كمية من اليود وذلك في وسط حامضي (باضافة كمية من حامض الهيدروكلوريك) وفي وجود كمية من ايونات الزنك (باضافة كمية من محلول كبريتات الزنك) لجعل التفاعل يسير الى الجهة اليمنى لترسب مادة سيانيد حديديك الزنك والبوتاسيوم .

ويتم تسحيح اليود المتحرر مع ثيوكبريتات الصوديوم مع استخدام النشا ككاشف .

$$(I_2 + 2S_2\bar{O}_3 \longrightarrow 2I + S_4O_6)$$

ملحوظة (يستخدم محلول قياسي من ايودات البوتاسيوم لتحديد عيارية ثيوكبريتات البوتاسيوم بالضبط .

جمع نموذج الدم :

يتم جمع (0.5 - 0.7) مللي لتر من الدم الوريدي او الدم الوريدي او الدم الشرياني من شعيرات الدم بقمة الابهام او حلمة الاذن (ear – lobe) وذلك في انابيب صغيرة تحتوي على مادة مانعة للتخثر (مثل اوكسالات البوتاسيوم) ومادة فلوريد الصوديوم المانعة لتحلل الجلوكوز .

كما يمكن جمع حجم معين من الدم باستخدام ماصة دقيقة قياسية (standard micropipette) واضافته فورا لمحلول متوازن الضغط الازموزي او متساوي التوتر مع الدم (isotonic solution) ثم ترسيب البروتينات في الحال (حتى توقف نشاط الانزيمات المحللة لسكر الكلوكوز) .

وبصفة عامة يتم اخذ النماذج من المريض الصائم الا اذا اشير الى خلاف ذلك .

طريقة العمل :

ضع في ثلاثة انابيب اختبار المواد التالية :-

* (1.0) مللي لتر من هيدروكسيد الصوديوم (0.1) عياري .
* (5) مللي لتر كبريتات الزنك (0.45%) .

اخلط جيدا ثم اضف بواسطة ماصة شعرية (capillary pipette)

أ - الى الانبوبة الاولى وتسمى انبوب الاختبار للنموذج (0.1) مللي لتر من الدم تحت الفحص . وتنظيف الماصة الشعرية بواسطة المحلول عدة مرات ثم يخلط جيدا .

ب - الى الانبوبة الثانية وتسمى انبوب الغفل او الكفيء (blank) يضاف (0.1) مللي لتر من الماء المقطر .

ج - الى الانبوب الثالث ويسمى الانبوب القياسي (standard) يضاف (0.1) مللي لتر من محلول قياسي من الكلوكوز معلوم التركيز .

ضع الانابيب الثلاثة في حمام ماء يغلي ولمدة اربعة دقائق ثم برد ورشح خلال ورقة ترشيح خالية من السكر (ويفضل غسلها بالماء المقطر) ويجمع الرشيح في انابيب تسحيح .

ثم اغسل الانبوب الاصلي وورقة الترشيح مرتين مستخدما (3) مللي لتر من الماء المقطر في كل مرة (يعاد الترشيح لمرة ثانية اذا ظهرت اي عكارة بالرشيح الاول اغسل الانبوب وورقة الترشيح بقليل من الماء) وبعد ذلك اضف لكل انبوبة :-
(2) مللي لتر من سيانيد حديديك البوتاسيوم(0.005N) مستخدما ماصة حجمية ثم ضع الانابيب في ماء بارد .

ملحوظة :-

اذا فقد المحلول لونه تماما مما يدل على استهلاك جميع سيانيد حديديك البوتاسيوم فعندئذ

يعاد الفحص مستخدما (0.05) مللي لتر من الدم ويضرب الناتج في (2) لتحصل على التركيز الصحيح .
في حالة استمرار لون المحلول نكمل الطريقة كما يلي :ـ
يضاف (3) مللي لتر من مزيج (كلوريد الصوديوم وكبريتات الزنك) .
ثم (0.5) مللي لتر من ايوديد البوتاسيوم (15%) .

ثم (2 او 4) مللي لتر من حامض الهيدروكلوريك (5%) سحح فورا بثيوكبريتات الصوديوم مستخدما سحاحة دقيقة (microburette) وحتى يتحول لون اليود البني الى لون اصفر باهت . بعدها اضف ثلاثة نقاط من محلول النشا والذي يعمل كمؤشر لتقدير نقطة النهاية) واستمر بالتسحيح ولحين اختفاء اللون الازرق دلالة على الوصول الى نهاية عملية التسحيح اي ما تعرف بال (end – point) ولنفرض ان :ـ
ن = مللي لترات استعملت في تسحيح انبوب نموذج الدم .
ي = مللي لتر استعملت في تسحيح الكفىء .
ق = مللي لتر استعملت في تسحيح انبوب القياسي .

ملاحظات :
1 ـ اذا كانت قيمة تسحيح الكفىء اقل من (1.88) مللي لتر . فيجب تبديل الماء المستخدم .
2 ـ يفضل ايجاد معامل تصحيح عيارية ثايوكبريتات الصوديوم على فترات متقطعة وذلك باجراء التجربة التالية .

(12) مللي لتر ماء مغلي
(2) مللي لتر من محلول ايودات البوتاسيوم (0.005N) .
(3) مللي لتر من محلول مزيج (كلوريد البوتاسيوم وكبريتات الزنك) .
(0.5) مللي لتر من محلول ايوديد البوتاسيوم .
(2) مللي لتر من محلول الهيدروكلوريك وسحح لحين تحول اليود المتحرر الى الاصفر الباهت ثم اضف ثلاثة نقاط من محلول النشا واستمر في التسحيح لحين اختفاء اللون .

ولنفرض استخدام (Y) مللي لتر في هذه العملية .

معامل التصحيح (م) = $\frac{(2)}{Y}$ وذلك لان محلول ثيوكبريتات الصوديوم اذا كان (0.005) عياري بالضبط فان عملية التسحيح تحتاج الى (2) مللي لتر تماما .

طريقة الحساب : عند اتباع هذا الاجراء فان (1) مللي لتر من ثيوكبريتات الصوديوم تعادل (0.174) مللي غرام كلوكوز .

(ي − ن) × م × (0.174) × (1000) = مللي غرام كلوكوز / (100) سم3 من الدم :

واذا كانت كمية الدم المستخدمة (0.05) مللي لتر فان النتيجة يجب ضربها في (2) للحصول على النتيجة الصحيحة .

ان القيم الطبيعية لسكر الكلوكوز في الدم باتباع هذه الطريقة هي :
(70 – 110) مللي غرام كلوكوز / (100)سم3 من الدم .

جدول (1) خطوات العمل لتقدير الجلوكوز (طريقة هجدورن)

المحلول*	النموذج	الكفيء	القياس
هيدروكسيد الصوديوم	1.0	1.0	1.0
كبريتات الزنك	5.0	5.0	5.0
	أخلط جيداً ثم أضف		
مصل الدم	0.1	—	—
ماء مقطر	—	0.1	—
محلول قياسي	—	—	0.1
	أخلط جيداً وضع في حمام ماء يغلي ولمدة 4 دقائق ثم برد ورشح مع غسل الانبوب وورقة الترشيح 3 مرات مستخدماً في كل مرة 3 مللي لتر من الماء المقطر ثم أضف الى الراشح .		
سيانيد حديديك البوتاسيوم	2	2	2
مزيج كلوريد الصوديوم وكبريتات الزنك	3	3	3
آيوديد البوتاسيوم	0.5	0.5	0.5
محلول حامض الهيدروكلوريك	2	2	2
سحح بمحلول ثيوكبريتات الصوديوم	ن	ى	ق

ثم طبق طريقة الحساب المذكور في التجربة

* الحجوم الموضحة بالمللي لتر .

المحاليل :

1) محلول هيدروكسيد الصوديوم (0.1 N)

يحضر باذابة 4 غرامات من هيدروكسيد الصوديوم النقي في (1000) مللي لتر من الماء المقطر .

2) محلول كبريتات الزنك (4.5%)

45 غرام كبريتات الزنك ($ZnSO_4.7H_2O$) ذات (7) جزئيات ماء التبلور في (1000) مللي لتر من الماء المقطر ورشح اذا كان ذلك ضروريا .

محلول سيانيد حديديك البوتاسيوم (0.006N)

(1.652) غرام من سيانيد حديديك البوتاسيوم
(174) غرام ثنائي بوتاسيوم احادي هيدروجين الفوسفات (K_2HPO_4)
(11.2) غرام هيدروكسيد البوتاسيوم
في (1000) مللي لتر من الماء المقطر المغلي واحفظ المحلول في قنينة بنية اللون .

كبريتات الزنك 0.45%

خفف (10) مللي لتر من كبريتات الزنك تركيز (4.5%) الى (100) مللي لتر من الماء المقطر .

محلول خليط من (كلوريد الصوديوم - كبريتات الزنك)

(50) غرام كبريتات الزنك ذات (7) جزيات ماء متبلور
(250) غرام كلوريد الصوديوم

(1000) مللي لتر من الماء المقطر رشح اذا كان ذلك ضروريا .

أيوديد البوتاسيوم (15%)

(15) غرام من ايوديد البوتاسيوم في (100) مللي لتر من الماء المقطر . واحفظها في قنينة بنية اللون .

حامض الهيدروكلوريك (%5)

(66) مللي لتر من حامض الهيدروكلوريك تركيز (38%) في (500) مللي لتر من الماء المقطر .

محلول ثيوكبريتات الصوديوم (0.1 N)

(12.4) غرام من ثيوكبريتات الصوديوم ذات 5 جزئيات من ماء التبلور .
(100) مللي غرام من كربونات الصوديوم ذات (10) جزيئات من ماء التبلور .
في (500) مللي لتر من الماء المغلي . واضف حوالي (10) مللي غرام من ايوديد الزئبق (HgI_2)

محلول ثيوكبريتات الصوديوم (0.005N)

(5) . مللي لتر من محلول ثيوكبريتات الصوديوم (0.1 N) وخفف الى (100) مللي لتر بالماء المغلي المبرد . تحضر يوميا طازجا .

محلول النشا

(1) غرام من النشا القابل للذوبان في (100) مللي لتر من الماء المقطر .

محلول ايودات البوتاسيوم (0.005N)

(0.178) غرام من ايودات البوتاسيوم (KIO_3) في ـ (1000) مللي لتر من الماء المغلي .

طريقة الاختزال لكبريتات النحاس

تعتمد الطرق المتبعة لتقدير سكر الكلوكوز في الدم على :

1 - قوة الكلوكوز على اختزال بعض المركبات مثل كبريتات النحاس القلوية وذلك لوجود مجموعة الالدهيدات ذات القدرة الكبيرة على الاختزال . ويستخدم في هذه التجارب رشح الدم بعد ترسيب وازالة البروتينات . ومن الضروري في هذه الطرق العمل على عدم تدخل المواد المختزلة الاخرى الموجودة في الدم (ومنها مادة الجلوتاثيون glutathione) وهو مركب ثلاثي الببتيد ذات القدرة الاختزالية العالية لوجود مجموعة (SH–). ويطلق على هذه المركبات غير الجلوكوز ذات القدرة الاختزالية اسم مشابه السكريات (sacchariod) والتي تصل كميتها 10–20 مللي غرام في كل 100 سم3 .

طريقة العمل :

الطريقة اللونية لكنج (clourimetric method for king 1959) تضاف كمية من الدم الى محلول سوى التوتر من كبريتات النحاس ثم يرسب البروتينات بواسطة تنكستات الصوديوم ونحصل على رشح رائق . ثم يتم تسخين الرشح مع محلول كبريتات النحاس القاعدي وعندئذ تتم اختزال جزءا من ايونات النحاسيك بما يعادل كمية الكلوكوز الموجودة في النموذج وتعطي ايونات النحاسوز وهذه الاخيرة تختزل حامض الفوسفوموليبديك (phosphomolybdic acid) او حامض زرنيخ المولبيديك (arsenomolypdic acid) عديمي اللون الى مولبيد او حامض زرنيخ المولبيد (phosphomolybdous acid) ذات اللون الازرق .

وتتم مقارنةاللون الازرق الناتج مع نظيره الناتج من محلول قياسي الكلوكوز .

الطريقة :

الاختبار (مزدوج) :

يضاف 0.1 مللي لتر من الدم او المصل الى 3.7 مللي لتر من محلول كبريتات النحاس - كبريتات الصوديوم سوى التوتر ومحتواة . في انبوبة منبذة مخروطية الشكل .

ثم يضاف 0.2 مللي لتر من محلول تنكستات الصوديوم ويمزج الخليط ويترك لمدة 10 دقائق لترسيب البروتينات والكمية الزائدة من تنكستات النحاس أنبذ ثم انقل 1 مللي لتر من المحلول الرائق العلوي (مع عدم حدوث اي اضطراب بالراسب) الى انبوبة اختبار نظيفة وجافة ويضاف اليه (1) مللي لتر من مزيج محلول النحاس القاعدي ويتم المزج جيداً .

اختبار الكفيء لنموذج الدم :

0.1 مللي لتر من الماء المقطر ويعامل معاملة الدم تماماً .

المحلول القياسي : (مزدوج)

يتم معاملة (1) مللي لتر من محلول الكلوكوز القياسي تماماً كمعاملـة (1) مللي لتر من رشيح الدم .

انبوب الكفيء للمحلول القياسي :

يتم معاملة (1) مللي لتر من الماء المقطر مثل ماهو اعلاه بالنسبة للمحلول القياسي .

توضع جميع الانابيب بعد غلقها بـداد غير محكمة من القطن في حمام ماء مغلي ولمدة عشرة دقائق بالضبط ثم تبرد الانابيب فورا تحت مـاء الصنبور وتضـاف 3 مللي لتر من محلول الزرنيخ الملوبديك او محلول فوسفو موليبدك ويمزج الخليط بعنايـة خوفـا من الفوران الشـديـد نتيجـة تصـاعـد ثـاني اوكسيـد الكاربون . ثم يضـاف (5) مللي لتر من المـاء المقطر ويقرأ اللون الازرق الناتج عند الموجة الضوئية (700) او باستخدام المرشح .

الحساب :

لنفرض ان (ت 1 هو تركيز المحلول القياسي بالمللي غرام لكل مللي لتر = 0.02
فأن تركيز الكلوكوز بالنموذج (ت2)

$$\text{ت}2 = \frac{\text{قراءة نموذج الدم} - \text{قراءة كفيء الاختبار}}{\text{قراءة محلول القياسي} - \text{قراءة كفيء القياسي}} \times 0.02 \times \frac{100}{0.025}$$

حيث ان 0.025 = حجم الدم او المصل في (1) مللي لتر من الرشيح بعد ترسيب البروتينـات .
وللتحويل الى وحدات دولية international units اضرب بالمعامل m.mol/L 0.0555 .

جدول (2) يوضح خطوات العمل لتقدير الجلكوز (طريقة الاختزال)

المحلول*	النموذج	الكفيء	القياسي
مزيج كبريتات النحاس	3.7	3.7	3.7
وكبريتات الصوديوم			
الدم في البلازما أو المصل	0.1	—	—
ماء مقطر	—	0.1	—
محلول قياسي	—	—	0.1
	أخلط جيداً واترك لمدة عشرة دقائق لضمان ترسيب البروتينات في النموذج ثم ضع في جهاز الطرد المركزي لمدة 10 دقائق عند 3000 لفة/ دقيقة ثم ضع 1سم3 من المحلول العلوي الرائق في انبوب اختبار وأضف		
محلول النحاس القاعدي	1	1	1
	تغلق الانابيب بقطعة من القطن وتوضع في حمام ماء يغلي لمدة 10 دقائق ثم تبرد تحت ماء الصنبور فوراً ويضاف .		
محلول الزرنيخ الموليبديك	3	3	3
	مزج الخليط جيداً وبعناية مع تجنب حدوث فوران شديد ويضاف		
ماء مقطر	5	5	5
	تمزج الانابيب جيداً ويقرأ اللون عند 700 مللي ميكرون .		

ثم طبق طريقة الحساب المذكور في التجربة .

* الحجوم الموضحة في الجدول بالمللي لتر .

المحاليل

محلول كبريتات النحاس - كبريتات الصوديوم سوى التوتر :

وهو خليط من 320 مللي لتر من كبريتات الصوديوم تركيز 3% ($Na_2SO_4 . 10H_2O$) و 30 مللي لتر من ($CuSO_4 . 5H_2O$) كبريتات النحاس تركيز 7% .

محلول تنكستات الصوديوم : 10 غرامات في 100 مللي لتر ماء مقطر .

محلول النحاس القاعدي : (يحضر طازجا بمزج حجوم متساوية من محلول أ ، محلول ب)

1) محلول (أ)

13 غرام ($CUSO_4 . 5H_2O$) في 1000 مللي لتر .

2) المحلول القاعدي (ب)

يتم تذويب 50 غرام من ($NaHCO_3$) في دورق به 700 مللي لتر من الماء المقطر . وبعد تمام ذوبان جميع البيكربونات يتم اضافة 40 غرام من كاربونات الصوديوم اللامائية مع التحريك السريع وعند ذوبان الكاربونات يتم اضافة محلول اوكسالات البوتاسيوم والمحضر باذابة 36.8 غرام في 120 مللي لتر من الماء الدافيء) ويمزج الخليط جيدا .

وفي النهاية يتم اضافة محلول تارتارات البوتاسيوم والصوديوم (المحضر باذابة 24 غرام في حوالي 100 مللي لتر من الماء المقطر) . ويحول المحلول الناتج الى قارورة حجمية سعة واحد لتر ثم يكمل الحجم الى العلامة ويمزج المحلول جيدا .

محلول حامض الزرنيخ المو لبديك :

يتم تذويب 25 غرام من مولبدات الامونيوم في 450 مللي لتر ماء . يتم اضافة 21 مللي لتر من حامض الكبريتيك المركز ثم يضاف محلول يتم تكوينه باذابة 3 غرامات من زرنيخات الصوديوم المائية في 35 مللي لتر من الماء المقطر .

ويمزج الخليط جيدا ويحفظ لمدة يومين بحمام مائي عند درجة 37 م ويخزن في قنينة بنية .

وعند الاستعمال يتم تخفيف حجم واحد من هذا الكاشف بحجمين من الماء (ويجب ان تكون جميع المواد الكيمياوية المستخدمة اعلاه من نوع انالار .

محلول القياسي لخزين الكلوكوز :

يستحضر بأذابة 0.1 غم من الكلوكوز النقي الجاف في ماء مقطر لغاية 100 مللي .

محلول القياسي للتشغيل : ويحضر بتخفيف 2 مللي لتر من محلول الخزين لغاية 100 مللي لتر من الماء المقطر .

طريقة الانزيم مؤكسد الجلوكوز

اوكسيديز الكلوكوز انزيم بكتين ذو نشاط نوعي وخاص يعمل على اكسدة الكلوكوز مع انتاج كمية معادلة من فوق اوكسيد الهيدروجين . وفي وجود انزيم اخر هو الانزيم فوق المؤكسد والذي يمكن بواسطته تحويل الاوكسجين من فوق اوكسيد الهيدروجين الى قابل ملائم مثل الاورثوتولويدين مع انتاج مادة نهائية ملونة والتي يمكن عن طريقة قياس لونها معرفة تركيز الكلوكوز في النموذج .

أختبارات تحمل الكربوهيدرات

الاختبار القياسي لتحمل الجلوكوز عن طريق الفم :

Standard Oral Glucose Tolerance Test

إن مدى ارتفاع ودوام المستوى العالي لسكر الجلوكوز في الدم بعد تناول كمية قياسية من الجلوكوز تعتبر طريقة معتمدة من العلماء لقياس الوظيفة الغدية للبنكرياس. لأفراز الانسولين ولقد قدم العلماء نماذج مختلفة من الجرعات ولكن الجرعة شائعة الاستعمال هي إعطاء 100 جرام من الجلوكوز مذابة في كوب ماء وذلك بالنسبة للبالغين ، أما الصغار فتحسب الجرعة بواقع 1.75 جرام/ كيلو جرام من وزن الجسم ، ونشير الى أن تناول هذه الجرعة من الجلوكوز قد تسبب الشعور بطلب القيء وهذا قد يؤثر على النتيجة ، ومن ثم فقد بذلت عدة محاولات لتحسين ظروف تناول الجرعة باضافة بعض المواد الملونة والمحسنة للمذاق بشريطة أن لا تحتوي على كربوهيدرات أخرى أو مواد تؤثر على إمتصاص الجلوكوز .

ويتم الاختبار عادة على الشخص الممتنع عن الطعام طوال الليل ويتم جمع عينات من الدم والبول قبل تناول جرعة الجلوكوز ثم على فترات 1/2 ، 1 ، 2 ، 3 ساعات بعد تناولها وفي بعض الحالات قد تستلزم الدراسة جمع عينات عند 4 ، 5 ، 6 ساعات بعد الجرعة وتسجل النتائج لتوضيح أعلى مستوى وصل اليه معدل الجلوكوز بالدم والسرعة التي يعود فيها المعدل الى المستوى الطبيعي .

وعند الشخص الطبيعي لايظهر سكر في عينات البول ، كما أن أعلى مستوى للجلوكوز يحدث خلال ساعة بعد تناول جرعة المائة جرام جلوكوز . ومعدل القمة غالباً مايكون في حدود 160 جرام/ 100 مل مصل الدم ، وبعد الجرعة بساعتين غالباً مايصل المعدل إلى قرب المستوى الطبيعي والذي يصل اليه فعلاً بعد 3 ساعات من الجرعة .

وفي بعض الحالات من مرض السكر قد يظهر منحني الجلوكوز في الدم قريباً من الطبيعي بسبب فقدان كمية كبيرة من الجلوكوز في البول كما أن منحني الجلوكوز قد لايظهر تغيرات ذات مدلول في المراحل الأولى من الاصابة بمرض السكر ومن ثم فيجب إعادة الاختبار عدة مرات على فترات وخاصة اذا كانت هناك أعراض إكلينيكية تشير الى وجود المرض .

إختبار تحمل للجلوكوز باعطاء جرعتين على مدى ساعة :

لتبسيط إجراء إختبار تحمل الجلوكوز ، أقترح تقسيم الجرعة على دفعتين كل منها 50 جرام على فارق زمني مدته 30 دقيقة . وتبعا لهذا الأختبار تؤخذ عينه دم من المريض ثم

يعطى الجرعة الاولى من 50 جرام وتؤخذ عينه بعد نصف ساعة ثم تعطى الجرعة الثانية وتؤخذ عينة بعد 30 دقيقة أخرى كما تجمع عينة بول في نفس وقت جمع عينات الدم الثلاثة .

تجربة تحمل الكلوكوز ذو جرعتين

الطريقة :

1 - اسحب الدم من المريض الصائم واجمع الادرار .
2 - أذب 50غم كلوكوز في حوالي 325 مللي لتر ماء وأضف اليه كمية من عصير الليمون لجعل طعم المحلول مقبولاً ثم ذلك يعطى للمريض .
3 - بعد مرور 30 دقيقة يسحب دم المريض ويجمع الادرار .
4 - ثم يعطى للمريض جرعة أخرى من محلول الكلوكوز المحضر كالسابق .
5 - بعد مرور 30 دقيقة يسحب دم المريض ويجمع الادرار .
6 - وبعد مرور 60 دقيقة كذلك يسحب الدم ويجمع الادرار .
7 - يعين كمية السكر في نماذج الدم والادرار كما في طريقة تعيين السكر في الدم .

النتيجة : بعد مرور ساعة واحدة من أخذ الجرعة الاولى من محلول الكلوكوز :-

A - مستوى السكر في الدم أقل من 158 ملغم/100 مللي لتر مصل يشير الى ان المريض ليس مصاباً بداء السكر .
B - اذا كانت النتيجة بين 158-179 ملغم /لكل 100 مللي لتر مصل يكون أصابة المريض بداء السكر مشكوكاً به .
C - اذا كانت النتيجة بين 180-260 ملغم لكل 100 مللي لتر مصل فانها تشير الى ظهور بوادر داء السكر لدى المريض .
D - اذا كانت النتيجة أعلى من 260 ملغم لكل 100 مللي لتر مصل يكون المريض مصاباً بداء السكر المتقدم .

اختبار تحمل الجلوكوز لساعتين :

يؤكد العديد من العلماء على ان اعطاء جرعة الجلوكوز بمعدل 100 جرام للفرد البالغ ثم تقدير سكر الدم بعد ساعتين ذات أهمية كبرى في الكشف على حالات السكر البولي وتدل النتائج على أن وجود مستوى للجلوكوز في الدم يزيد على 140 ملجم/100 مل بعد ساعتين من الجرعة يشير بصفة شبه مؤكدة على وجود مرض السكر .

إختبار تحمل الجلوكوز عن طريق الحقن في الوريد :

عند بعض المرضى الذين يشكون من اضطرابات في الجهاز الهضمي والتي قد تؤثر على أمتصاص السكر في الامعاء من المستحسن إجراء أختبار التحمل عن طريق الحقن في الوريد . وتحسب الجرعة بواقع 0.5 جرام/كيلو جرام من وزن الجسم وتحقن على شكل محلول تركيز 20% على فترة زمنية تقدر بنصف ساعة . وكبقية الاختبارات السابقة تجمع عينة دم وبول قبل الحقن ثم بعد 1/2.1 ، 2 ، 3 ساعات بعد اكتمال الحقن .

إن هذا الاختبار عن طريق حقن الجلوكوز في الوريد قد يؤدي الى ظهور الجلوكوز في البول حتى عند الاشخاص الطبيعيين حيث أن سكر الدم ترتفع بنسبة قد يفوق قدرة الكلية على الحفاظ على الجلوكوز ولكن عند الاصحاء لا يزيد معدل الجلوكوز في الدم عن 110 ملجم/100 مل بعد ساعتين من اتمام الحقن وفي المتوسط يكون معدل انخفاض سكر الدم بواقع 1%–3 كل دقيقة في حين عند مرضى السكر يكون معدل الجلوكوز في الدم مرتفع ونسبة الانخفاض أقل بكثير عن المعدل المذكور للاشخاص الطبيعيين .

اختبار تحمل الجلوكوز – أنسيولين :

إن إعطاء الجلوكوز في نفس الوقت أو مباشرة بعد جرعة الأنسيولين يمكن أن تكشف عن حساسية زائدة للأنسيولين أو مقاومة للهرمون . يصوم المريض طوال الليل ثم يعطى في الصباح جرعة أنسيولين بمعدل 0.1 وحدة أنسيولين/كجم من وزن الجسم عن طريق الوريد ثم يعطى مباشرة جرعة جلوكوز 100 جم أو بعد 30 دقيقة من أعطاء الانسيولين . تحت هذه الظروف فأن الأفراد الطبيعيين ومعظم مرضى السكر يظهرون تغير طفيف في مستوى الجلوكوز في الدم . وعلى العكس يظهر أرتفاع كبير في جلوكوز الدم عند مرض Cushing's disease. أن إعطاء جرعة الجلوكوز نصف ساعة بعد جرعة الأنسيولين ينصح بأتباعها عند الاشخاص الذين

يشك في وجود نقص في نشاط الغدة الكظرية أو الغدة النخامية لتجنب حدوث انخفاض شديد في سكر الدم .

إختبار تحمل الجلوكوز - كورتيزون :

إن اعطاء الكورتيزون مع أختبار تحمل الجلوكوز يساعد كثيراً في الكشف على حالات مرض السكر المعتدلة . وينحصر الاختبار في إعطاء 50 ملج كورتيزون عن طريق الفم قبل إعطاء جرعة الجلوكوز (100 جرام عن طريق الفم) بثمانية ساعات ونصف .

إن الافراد الطبيعيين يظهر لديهم منحنى تحمل جلوكوز مرتفع قليلاً عما يظهر بدون إعطاء الكورتيزون وعلى العكس عند حالات مرض السكر المعتدلة يظهر لديهم منحني مرتفع وغير طبيعي وأن معدل الجلوكوز في الدم بعد ساعة من الجرعة يكون أعلى من 180 ملجم/100 مل (لايصل هذا المعدل بأية حال عند الأشخاص الاصحاء الطبيعيين) .

إختبار تحمل الجالاكتوز :

إن عملية تحول الجالاكتوز الى جلوكوز ثم الى جليوكوجين تختل في حالات أمراض الكبد ويرجع اجراء هذا الأختبار للعالم Bauer لفحص أحدى وظائف الكبد. وينحصر الاختبار في اعطاء 40 جم جالاكتوز وتقدير كمية السكر الاحادي في البول على مدى 5 ساعات، كما يساعد تقدير الجالاكتوز في الدم كمؤشر لنشاط الكبد في استخدام الجالاكتوز . ودلت النتائج على أنه بعد أعطاء جرعة الجالاكتوز عن طريق الفم كان أقل من 3 جرام تفرز عادة خلال 5 ساعات في البول كما أن مستوى الجالاكتوز في الدم نادراً ما يزيد على 80 - 100ملجم/100 مل .

وهناك اختبار عن طريق حقن الجالاكتوز في الوريد لتجنب صعوبة الامتصاص في الامعاء . وتستلزم هذه الطريقة حقن 1 مل تركيز 50% جالاكتوز خلال 3 - 5 دقائق ثم يقدر مستوى الجالاكتوز بعد 15 ، 45 دقيقة ويحسب ثابت إزالة الجالاكتوز من الدم (glalactose–removal constant) تبعاً للمعادلة الآتية .

$$K = \frac{2.3\ (\text{Log } C_1 - \text{Log } C_2)}{T_2 - T_1}$$

حيث ان C_1 ، C_2 معدل الجالاكتوز عند T_1 ، T_2 ، وعادة لا يزيد مستوى الجالاكتوز في الدم عند 45 دقيقة بعد الحقن عن 100 ملجم/100 مل ويصل ثابت إزالة الجالاكتوز مابين 4.2 - 9.5 عند الأصحاء .

إختبار تحمل النشا :

إن أجراء أختبار تحمل النشا عن طريق إعطاء جرعة 100 جرام من النشا القابل للذوبان في الماء ومقارنته مع منحني تحمل الجلوكوز (100 جرام) يعكس كفاءة نشاط البنكرياس الخارجي (exocrine) . إن انخفاض معدل ارتفاع الجلوكوز في الدم بعد إعطاء النشا (عما يحدث بعد إعطاء الجلوكوز) يشير الى وجود نقص في نشاط البنكرياس الخارجي .

إختبار تحمل السكريات الثنائية :

إن كفاءة هضم السكريات الثنائية (السكروز - اللاكتوز - المالتوز - السلوبيوز) يمكن الحكم عليها من تقدير مستوى سكر الجلوكوز في الدم بعد إعطاء جرعة 50 جم من السكر الثنائي . إن هذا الأختبار يمكن أن يساعد على الكشف على نقص في انزيم B–galactosidase ومن ثم يمنع إعطاء اللاكتوز لهؤلاء المرضى .

إختبار تحمل الزيلوز :

إن السكر الخماسي D–xylose لايوجد بصفة طبيعية في الدم ولكن يمكن أن يمتص في الامعاء بدون المرور في عمليات هضم ولا يتوقف على وجود عصارة الصفراء أو العصارة البنكرياسية . كما وجد أن سرعة أفراز الزيلوز في البول يمكن أن يكون مؤشراً على السرعة التي يمتص بها في الامعاء اي كمقياس لقدرة الأمعاء على الامتصاص . أن كمية الزيلوز التي تطرح في البول انما تعكس وظيفة الكبيبات في الترشيح ولا تتوقف على معدل سريان البول (urine flow rate) .

ولأجراء الاختبار يعطى الفرد 25 جرام D–xylose مذابة في الماء بعد صيام طوال الليل ويجمع البول خلال 5 ساعات من إعطاء الجرعة ويقدر الزيلوز في البول بالطريقة اللونية مستخدماً الكاشف P–bromoaniline ، وتبلغ كمية الزيلوز التي تطرح خلال 5 ساعات مابين 3 - 9 (متوسط 6) جرام وتقل الكمية المطروحة في بعض امراض الجهاز الهضمي مثل celiac disease, sprue .

إختبار تصفية الانيولين : inulin clearance test

إن طرح الأنيولين (سكر عديد من وحدات الفركتوز) يستخدم لأختبار سرعة الترشيح في

الكبيبات . ويجري الأختبار بحقن محلول خالي من البيروجين ويحتوي على 25 - 50 جرام من الأنيولين وتجمع عينات من البول والدم عند مواعيد محددة . ويبلغ معدل تصفية الأنيولين بين 75 - 150 مل/ m²1.73 من سطح الجسم والطرق المتبعة لتقدير الانيولين تعتمد على تحويل الانيولين الى فركتوز وتقدير الأخير بتفاعله مع diphenylamine, resorcinol أو indole -3- aceticacid وتقدير تركيز اللون الناتج ومقارنته مع محلول فركتوز قياسي .

الكولسترول Cholesterol

الكولسترول مادة دهنية مشتقة (derived lipid) ويوجد منه كميات في الدم وسائل الصفراء ، ونسيج الدماغ ، والجهاز العصبي .

ومادة الكولسترول تعتبر المادة المنشئة (precursor) الاساسية لتكوين الاحماض الصفراء (bile acids) والهرمونات الاسترويدية (steroid hormone) ويوجد الكولسترول في الدم على صورتين اما حر واما على صورة ملح مشتق (ester derivative) فان (30%) من مجموع الكولسترول في المصل الطبيعي يكون حرا (free) في حين ان كمية ال (70%) الباقية توجد على هيئة استرات مع الاحماض الدهنية وتتم عملية الاسترة في الكبد بصورة رئيسية ويمكن تعين الكولسترول الحر بصورة مستقلة وذلك بتحضير المصل مع مادة الديجيتونين (digitonin) والتي تعمل على تكوين مركب غير ذائب مع الكولسترول الحر وبذا يترسب تاركا الكولسترول في المحلول والتي يمكن عندئذ تقديرها على حدة .

يرتفع مستوى مجموع الكولسترول في المصل في حالات الورام الاصفر (xanthomatosis) والخزب المخاطي (myxedema) وداء السكر (diabetes) ومتلازمة الكلية (nephrotic syndrome) واليرقان الانسدادي (obstructive jaundice) .

وينخفض مستوى الكولسترول استر في حالات امراض الكبد ويتناسب الانخفاض مع هبوط كفاءة ونشاط نسيج الكبد في تحويل الكولسترول الحر الى الاستر وتستخدم هذا الاختبار لمعرفة وتقدير نشاط وظائف الكبد .

طريقة العمل :

يتم الاستخلاص الكمي لمجموع الكولسترول من المصل الدم او الدم المكافىء وذلك بالمعالجة بخليط من الاسيتون والكحول او الأيثر والكحول وهذا الخليط يعمل ايضا في نفس الوقت على ترسيب البروتينات ثم يتم تبخير جزء من الخلاصة وحتى الجفاف مع ملاحظة عدم زيادة التسخين بعد الوصول الى حالة الجفاف . ثم تعالج ثمالة (residue) مجموع الكولسترول بكمية من حامض الخليك الجليدي (glacial acetic.acid) ويمزج الخليط جيدا ويتبع ذلك اضافة خليط من كلوريد الحديديك وحامض الكبريتيك . فينتج لونا احمرا يمكن قياسه ومقارنته باللون الناتج عن كمية قياسيه من الكولسترول .

جمع نموذج الدم :

تسحب (3-4) مللي لترات من الدم الوريدي ويترك مستقرا حتى تتم عملية التخثر ويفصل المصل ويستخدم الاخير لتقدير محتواه من الكولسترول .

النموذج تحت الفحص

ضع (9.5) مللي لتر من خليط الاسيتون والكحول في أنبوبة منبذة مخروطية ومؤشرة عند حجم (10) مللي لترات وبعدها اضف ببطء مع الرج بحرص (0.5) مللي لتر من المصل حتى يتم ترسيب البروتينات بكفاءة مع عدم تكتل بروتيني يعاكس استخلاص الكولسترول ويمكن اضافة المصل اولا في انبوب المنبذة ثم يضاف خليط الاسيتون والكحول مع نفخه من الماصة بقوة وذلك ليعمل على تشتت المصل والحصول على راسب ذو ندف دقيق مما يسهل عملية استخلاص الكولسترول . ضع الانبوب في حمام مائي عند درجة (60-70) م لمدة عشرة دقائق للمساعدة على ترسيب البروتينات واستكمال استخلاص الكولسترول ثم برد وصحح الحجم الى علامة ال (10) مللي لتر بواسطة خليط المذيب . اغلق الانبوب ونبذ لمدة ثلاثة دقائق بجهاز الطرد المركزي عند (3000) لفه في الدقيقة في هذه المرحلة يكون تركيز الكولسترول في المحلول (1/20) كان عليه في المصل الاصلي . حول (2.0) مللي لتر من الخلاصة الى وعاء انبوبه غليان وبخر حتى الجفاف مستخدما حمام مائي درجة (80c-90) متجنبا الحرارة الزائدة حتى لا يحدث تفحم ثم اضف (6) مللي لترات من حامض الخليك الجليدي وامزج جيدا لبضع دقائق في حمام مائي عند درجة الغليان ولحين الذوبان الكامل للثمالة ثم برد الى درجة حرارة الغرفة تحت ماء الصنبور .

انبوب القياس : اضف (0.1) مللي لتر من المحلول القياسي الى (5.9) مللي لتر من حامض الخليك الجليدي في وعاء مشابه للمستخدم اعلاه .

انبوب الكفىء : (6.0) مللي لترات من حامض الخليك الجليدي . الى جميع الانابيب اعلاه اضف : -(4.0) مللي لترات من الكاشف اللوني المخلوط والمحضر لتوه مع ضرورة اضافة الكاشف باعتناء وعلى جدار الانبوب ليشكل طبقة اسفل حامض الخليك . اخلط الان بشدة (بواسطة قضيب زجاجي او محرك ميكانيكي لضمان التوزيع المتساوي للحرارة) اترك لمدة عشرين دقيقة تقريبا ليبرد ولتصاعد فقاعات الهواء . قارن اللون عند (570 mμ) ومستخدما مرشح اصفر اللون (ملاحظة : اللون ثابت لمدة (30-60) دقيقة) .

الحساب : نظرا لاستخدام (2.0) مللي لتر فقط من اصل (10) سم3 من الخلاصة التي تم الحصول عليها فلتقدير مجموع الكولسترول في (100) مللي لتر من مصل الدم تطبق المعادلة الاتية :

مجموع الكولسترول بالمصل

$$= \frac{ص - ب}{س - ب} \times (0.2) \times \frac{(10)}{(2)} \times \frac{(100)}{(0.5)} = \frac{ص - ب}{س - ب} \times (200)$$

حيث ص = قراءة انبوب نموذج الدم .

س = قراءة انبوب النموذج القياسي .

ب = قراءة انبوب الكفىء .

يمكن استخدام نموذج من خليط من الامصال (pooled serum) ذو تركيز معين من الكولسترول كمرجع للتأكد من صحة التجربة ويعامل مثل المصل تماما .

في المعادلة اعلاه :-

(0.2)= كمية الكولسترول في (0.1) ملل لتر من المحلول القياسي ، (10/2) = لاننا استخدمنا (2) مللي لتر من الخلاصة والتي حجمها (10) ملل لتر (100/0.5) = للحصول على تركيز الكولسترول في (100) سم3 من المصل لاننا استخدمنا في التجربة (0.5) سم3 من المصل .

القيم الطبيعية عند الاصحاء :

(150–250) مللي غرام لكل (100) مللي لتر من مصل الدم . وهناك بعض المراجع التي تعتمد الحد الاعلى للمعدل الطبيعي الى بـ (300) مللي غرام وخاصة مع تقدير العمر فوق 50 سنة .

مصادر الخطأ :

ان نماذج المصل عادة تحتوي على كيات مختلفة من الحامض الاميني تربتوفان والذي يمكن ان يتفاعل مع اثار الالدهايد التي غالبا ما توجد في جميع التحضيرات التجارية لحامض الخليك الجليدي (حتى من النوع (analar)) ويعطي التفاعل لون احمر غامق والذي يمكن ذلك ان يتدخل في التجربة وبذا نحصل على تقديرات عالية جدا للكولسترول ولهذا يجب التأكد من ان حامض الخليك المستخدم يكون خاليا من الالدهايد (يتبع لذلك ما جاء تحت المحاليل) وعند اتباع جميع الاحتياطات بعين الاعتبار فان الطريقة المذكورة اعلاه تعطي نتائج جيدة ومناظرة لما نحصل عليه بطرق الاستخلاص الاكثر تعقيدا . ويجب ملاحظة ان مثل هذا التداخل لا يعوض من الكفىء والقياسي لانها لا تحتوي على التربيتوفان وفي الواقع فان استخدام نموذج من المصل المعروف تركيز الكولسترول به يفيد جدا كمرجع للتأكد من صحة التقدير وكفاءة المحاليل المستخدمة .

المحاليل :

حامض الخليك الجليدي الخالي من الالدهايد يمكن الحصول على هذا الحامض بهذه المواصفات تجاريا غير انه غالي الثمن . وبديلا لذلك يلزم اعادة تقطير حامض الخليك الجليدي على ثالث اوكسيد الكروم كما يلي : يترك الحامض فوق ثالث اوكسيد الكروم لمدة (24–48) ساعة ﴿حوالي (100) غرام لكل (2) لتر من الحامض ﴾ . ثم يقطر الحامض على اجزاء صغيرة ويفحص كل جزء على حدة عند وجود الالدهايد من عدمه ويهمل وان الجزء الاخير من التقطير حيث انه يحتوي على كمية كبيرة من الالدهايد واثناء عملية التقطير من الضروري تقليب الحامض جيدا امرار هواء مضغوط لضمان توزيع الحرارة بصفة منتظمة حيث ان حدوث زيادة في التسخين يؤدي الى فوران خطر (dangerous pumping) .

اختبار هوبكين ـ كول للالديهيدات : (Hopkins–Cole test for aldehydes)

خذ 2 مللي لتر من حامض الخليك المراد الكشف فيه على الالديهيد واضف قطرتين من محلول مشبع لحامض التربتوفان ثم قطرتين من محلول كبريتات الزئبقيك ﴿ 10 غرام/(100) سم3 في (3) ع حامض الكبريتيك ﴾ . امزج جيدا ثم اضف بعناية (2–5) مللي لتر من حامض الكبريتيك المركز على جدار الانبوبة لتتجمع كطبقة في اسفل الانبوبة . ظهور حلقة ارجوانية عند السطح الفاصل (junction surface) بين المحلولين يدل على وجود الالديهيد .

محلول كلوريد الحديديك :

تذاب (10) غرامات من كلوريد الحديديك في (100) مللي لتر في حامض الخليك الجليدي الخالي من الالدهايد ويهمل المحلول اذا ظهرت به اية رواسب وتحضر كمية طازجة .

حامض الكبريتيك المركز :

يجب ان يكون بنوعية نقية جدا (analar) وليس به اية اثار للون البني .

كاشف اللون :

اضف مع الخض الجيد (1.0) مللي لتر من محلول كلوريد الحديديك الى (15) مللي لتر من حامض الكبريتيك المركز الموجود في اسطوانة حجمية جافة ذو سعة (100) مللي لتر ثم اكمل الحجم الى (100) مللي لتر بحامض الكبريتيك المركز واخلط جيدا مرة اخرى ويجب ان يكون

المحلول صافيا وذو لون اصفر فاتح جدا ويجب ان يحضر فورا قبل الاستعمال ويهمل عند ظهور اي راسب او تعكر به . ان الظهور السريع للتعكير يرجع الى وجود قليل من الماء او لتلف محلول كلوريد الحديديك .

محلول الكوليسترول القياسي :

تذاب (200) غرام من الكولسترول النقي الجاف في (100) مللي لتر من حامض الخليك الجليدي الخالي من اللالدهايد .

جدول (3) يوضح خطوات عمل تقدير الكولسترول باستخدام الكاشف كلوريد الحديديك

المحلول*	النموذج	الكفيء	القياسي
مزيج الاسيتون والكحول	9.5	—	—
المصل	0.5	—	—
	أخلط جيداً واترك الانبوب لمدة عشرة دقائق في حمام مائي عند 60-70م وأعد ضبط الحجم الى العلامة 10 مللي لتر باستخدام مزيج الاسيتون والكحول ثم ضع في جهاز الطرد المركزي لمدة 3 دقائق عند 3000 لفة/دقيقة ثم حول 2 مللي لتر من المحلول العلوي الرائق الى انبوب غليان وبخر في حمام مائي عند 80-90م حتى الجفاف تقريباً ثم أضف .		
حامض خليك جليدي	6	6	5.9
محلول قياسي	—	—	0.1
	أخلط جيداً وضع في حمام مائي يغلي لمدة 3 دقائق ثم يبرد تحت الصنبور وأضف .		
الكاشف اللوني	4	4	4
	أخلط جيداً وأترك الانابيب في الظلام لمدة 20 دقيقة وأقرأ اللون عند 570 mᵐ .		

طبق طريقة الحساب الموضحة في التجربة .

* الحجوم الموضحة في الجدول بالمملي لتر .

طريقة اخرى لتقدير الكولسترول في الدم :

تعتمد هذه الطريقة على التفاعل المعروف باسم (Leibermann–Burchard reaction) حيث يعطي الكولسترول المذاب لون ازرق او ازرق مخضر عند اضافة كمية من حامض الخليك اللامائي (acetic acid anhdride) وحامض الكبريتيك المركز ويمكن تطبيق هذه الطريقة على الدم الكلي (Whole blood) او المصل او البلازما .

طريقة التعيين :

يمكن تلخيص خطوات العمل فيما يلي :-

1 - يوضع (10) سم3 من خليط من الكحول والاثير (بنسبة 8 : 2 مللي لتر) في انبوبة جهاز طرد مركزي مخروطية الطرف .

2 - يضاف (0.2) مللي لتر من الدم او المصل بحيث تكون سرعة الاضافة بطيئة مع الرج او الهز اثناء الاضافة حتى يترسب البروتين على هيئة خيوط رفيعة ولا تترسب على هيئة كتل تمنع من استخلاص الكولسترول من النموذج .

3 - ترج الانبوبة بعد ذلك جيدا وتوضع في وضع مائل (بزاوية 45) وذلك للعمل على زيادة مساحة سطح الراسب المعرض للمذيب للمساعدة على استخلاص الكولسترول وتترك الانبوبة في هذا الوضع لمدة نصف ساعة .

4 - توضع الانابيب بعد ذلك في جهاز الطرد المركزي تدار لمدة (5) دقائق عند (3000) لفة في الدقيقة ثم يسكب المحلول الرائق العلوي في جفنة خزف للتبخير (evaporating porcelain dish) وتوضع الجفنة على حمام مائي عند 90م لتبخير الكحول والاثير .

5 - عند تمام التبخير (لاتسخن اكثر من اللازم لان هذا قد يعمل على تحطيم الكولسترول واعطاء نتائج خطأ) برد الجفنة ثم اضف (5) مللي لتر من الكلوروفورم وحرك بقضيب زجاجي حتى يتم ذوبان الراسب المتبقي في الجفنة .

6 - اضف (2) مللي لتر من حامض الخليك اللامائي وحرك جيدا ثم اضف مع التقليب المستمر (0.1) مللي لتر من حامض الكبريتيك المركز .

7 - اترك الجفنة في الظلام لمدة 10 دقائق حتى يتم تكوين اللون ثم اقرأ مستخدما الموجة الضوئية (650 mu) او المرشح الضوئي الاحمر وقارن مع اللون الناتج من محلول قياسي معالج بنفس الطريقة .

المحاليل :

1 - كلوروفورم نقي خالي من الماء .
2 - حامض الخليك اللامائي النقي .
3 - حامض الكبريتيك المركز النقي .
4 - مزيج من الكحول والاثير بنسبة (2:8) .
5 - محلول الكولسترول القياس : (20) مللي غرام مذابة في (100) مللي لتر كلوروفورم .

الانبوب القياسي :

ان متوسط تركيز الكوليسترول في مصل الدم هو حوالي (200) مللي غرام في (100) مللي لتر وحيث انه قد استخدمنا (0.2) من الدم وهي تقابل بذلك كمية من الكولسترول تصل الى (0.4) مللي غرام لذلك يؤخذ من المحلول القياسي (2) مللي لتر وهي تعادل نفس الكمية من الكولسترول المتوقع وجودها في نموذج المصل ويكمل الحجم بالكلوروفورم الى (5) مللي لتر ثم تعامل كالنموذج باضافة حامض الخليك اللامائي وحامض الكبريتيك المركز الى نهاية التجربة . ويمكن في حالة توقع مستوى مرتفع من الكولسترول في الدم استخدام (4) مللي لتر من المحلول القياسي (وهي تعادل (0.8) مللي غرام والتي تكافىء مستوى كولسترول في الدم يصل الى (400) مللي غرام / (100) مللي لتر) ويمكن بناء منحنى قياسي (standard curve) طبقا لما يلي :-

Test tube No.	1	2	3	4	5	6
ml standard Cholesterol Solution...	Zero	1	2	3	4	5
(equivalent to...	Zero	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0mg
ml chloroform	5	4	3	2	1	zero
ml acetic anhydride	2	2	2	2	2	2
ml conc. H_2SO_4	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1

ويرسم منحني (خط مستقيم) يوضح العلاقة بين التركيز والكثافة الضوئية ويمكن استخدامه في ايجاد تركيز الكولسترول في النماذج التي يراد فحصها .

جدول (4) خطوات عمل تقدير الكوليسترول باستخدام حامض الخليك اللامائي

المحلول*	النموذج	الكفىء	القياس
مزيج الكحول والايثر	10	10	—
الدم أو المصل	0.2	—	—
محلول قياسي	—	—	2
	يرج انبوب النموذج جيداً ويترك في وضع مائل بزاوية 45 لمدة 30 دقيقة ثم يوضع في جهاز الطرد المركزي لمدة 5 دقائق عند 3000 لفة/ دقيقة ثم ينقل المحلول العلوي الرائق بالكامل الى جفنة تبخير وكذلك محتوى انابيب الكفيء والقياسي وتبخر المحاليل على حمام مائي عند 90م وحتى الجفاف تقريباً ثم تبرد كل جفنة ويضاف اليها:		
كلوروفورم	5	5	5
	حرك جيداً لأتمام ذوبان الراسب ثم يضاف		
حامض خليك لامائي	2	2	2
	يمزج جيداً ثم يضاف		
حامض كبريتيك مركز	0.1	0.1	0.1
	أخلط جيداً واترك في الظلام لمدة 10 دقائق وأقرأ اللون عند 650 mm		

طبق طريقة الحساب الموضحة في التجربة .

* الحجوم الموضحة في الجدول بالمللي لتر .

الطريقة الموحدة لتقدير الكولسترول في مصل الدم :

طريقة :-

أنبوب الفحص : ضع (1.9) من الكحول الاثيلي في أنبوب جهاز الطرد المركزي ثم أضف (0.1) مللي لتر من المصل وسد فوهة الانبوب وأخلط جيداً ثم ضع في جهاز الطرد المركزي (3000 دورة في الدقيقة)لمدة ثلاث دقائق .

أنبوب الكفىء : خذ (0.1) مللي لتر من الماء المقطر بدلاً من المصل وأكمل حسب الطريقة أعلاه . بعد عملية سنترفيوح أنقل (0.5) مللي لتر من المحلول العلوي الرائق من أنبوب الفحص ومن أنبوب الكفىء كل الى انبوب اختبار جاف ونظيف .

أضف (2) مللي لتر من محلول كاشف اللون ثم أضف قطرة فقطرة 2 مللي لتر من حامض الكبريتيك المركز مع الرج المستمر ثم أترك الانابيب لمدة (10) دقائق في الظلام .

أقرأ بجهاز مقياس على طول الموجة (560) مللي ميكرون ودون قراءة الكثافة الضوئية .

أنبوب القياسي :- خذ (0.5) مللي لتر من المحلول القياسي المعد للعمل ثم أضف الكاشف وحامض الكبريتيك وأكمل كما جاء اعلاه .

الحساب

$$\frac{ت - ب}{س - ب} \times 0.5 \times \frac{100}{0.025}$$

$$\frac{ت - ب}{س - ب} \times 200 = \text{ملغم/100 مللي لتر}$$

حيث ت = قراءة أنبوب النموذج

ب = قراءة الأنبوب الكفء

س = قراءة الأنبوب القياسي .

وللتحويل الى وحدات دولية m mol/L نضرب بالمعامل 0.025

جدول (5) الطريقة الموحدة لتقدير الكوليسترول في مصل الدم او البلازما

المحلول*	النموذج	الكفيء	القياس
كحول اثيلي	1.9	1.9	—
ماء مقطر	—	0.1	—
المصل أو البلازما	0.1	—	—
	أخلط جيداً وضع في جهاز الطرد المركزي		
	لمدة 3 دقائق عند 3000 لفة بالدقيقة		
	ثم أنقل الى أنبوب نظيف وجاف		
المحلول العلوي الرائق النموذج	0.5	—	—
المحلول الكفيء	—	0.5	—
المحلول القياسي	—	—	0.5
محلول كاشف اللون	2	2	2
حامض الكبريتيك (قطرة قطرة)	2	2	2
	أمزج جيداً واترك في الظلام لمدة 10 دقائق		
	وأقرأ اللون عند الموجة 560 mm		

طبق طريقة الحساب كما موضح في التجربة .

• الحجوم الموضحة في الجدول بالمللي لتر .

المحاليل

1 - كحول الاثيلي 95%
2 - كاشف اللون :- ويحضر بأذابة 100 ملغم من كلوريد الحديديك في 100 مللي لتر من خلات الأيثيل Ethylacetate .
3 - حامض كبريتيك مركز نقي " anlar "
4 - محلول كولسترول المخزون : يحضر بأذابة 200 ملغم من الكولسترول في 100 مللي لتر من الايثانول ويحفظ في قنينة محكمة بعيداً ويفضل في الثلاجة عند 4° مئوية .
5 - محلول الكولسترول للعمل : ويحضر بتخفيف (1) مللي لتر من محلول الخزين لغاية (20) مللي لتر من الايثانول .

البيليروبين (bilirubin)

مقدمة :

البيليروبين هو صبغة صفراء توجد في مصل الدم عند الاشخاص الطبيعيين بكيات قليلة وهي الصبغة التي تعطي اللون الاصفر الباهت المميز لمصل الدم .

ويبلغ تركيز البيليروبين الكلي في مصل الدم عند الاشخاص الطبيعيين من (0.0–1.0) مللي غرام / (100) مللي لتر . واذا ارتفع الى (2) مللي غرام/(100) مللي لتر فأنه يعطي لون أصفر فاتح لمصل الدم ولكن لايظهر اللون الاصفر على الجلد ومقلة العين ويطلق على هذه الحالة (subclinical jaundice) اما اذا زاد التركيز عن ذلك فيظهر اللون الاصفر على الجلد والعين وتعرف الحالة باليرقان (jaundice) ويمكن تقسيم البيليروبين الموجود في مصل الدم الى نوعين :–

أ – مقترن (conjugated) مع حامض جلوكيورونيك وتتم هذه العملية في الكبد .

ب – غير مقترن (بيليروبين حر) (free) or (unconjugated)

ويطلق على النوع الاول من البيلروبين انه ذو التفاعل المباشر (direct bilirubin reaction) حيث انه يعطي التفاعل الخاص بالبيلروبين مباشرة في حين يطلق على النوع الثاني البيلروبين ذو التفاعل الغير المباشر (indirect bilirubin reaction) حيث انه يعطي التفاعل الخاص بالبيلروبين بطريقة غير مباشرة وذلك لأنه لا يذوب في الماء ولذا فاحياناً يطلق عليه الجزء غير الذائب من البيلروبين ويوجد مرتبطاً ببروتين الالبيومين وعندما يرتفع تركيز البيلروبين في المصل تزداد شدة اللون الاصفر في مصل الدم واذا ماارتفع تركيزه بشكل اكبر ظهر اللون الاصفر في مقلة العين على الجلد وعندئذ يطلق على هذه الحالة اسم اليرقان (jaundice) ويمكن تقسيم اليرقان الى الانواع التالية :–

1 – يرقان انسدادي : (obstructive jaundice) ناتج عن انسداد مجرى الصفراء سواء الانابيب الصفراوية او عنق حويصلة الصفراء مما يؤدي الى رجوع (reflux) كيات كبيرة من البيلروبين الى الدورة الدموية .

2 – يرقان الانحلالي (haemolytic jaundice) وينتج هذا النوع عن التحلل المفرط لكريات الدم الحمراء .

3 – يرقان كبدي : (hepatic jaundice) وينتج عن تسمم خلايا الكبد مما يؤدي الى انخفاض نشاط الكبد في تمثيل البيلروبين .

طريقة العمل :

تعتمد الطريقة على تحويل البيلروبين الى مركب ارجواني (أحمر - بنفسجي) يدعى الازوبيليروبين (azobilirubin) وذلك بتفاعله مع الحامض السلفانيليك المتأزيد (diazotized sulphanilicacid) ان شدة اللون الناتج تتناسب مع كمية البيلروبين الموجودة ويمكن قياس تركيز اللون بجهاز مقياس اللون ومقارنته مع اللون الناتج عن محلول قياسي من البيلروبين معلوم التركيز يتفاعل البيلروبين المقترن مباشرة مع حامض السلفانيليك المتأزيد في المحلول المائي بينما يتطلب تقدير البيلروبين غير المقترن الى معجل (accelerator) يعمل على اذابته ويستخدم لهذا الغرض كحول المثيل وبذلك يمكن تقدير البيلروبين الكلي وبطرح الجزء المقترن نحصل على تركيز الجزء الغير مقترن .

ملاحظة : ان حامض السلفانيلك المتأزيد غير ثابت وعليه يجب تحضيره بكميات صغيرة وقبل الاستعمال مباشرة .

نموذج الدم :

تجمع (4.5) مللي لترات من الدم الوريدي في انبوبة اختبار ويفضل ان تكون بنية اللون ويحفظ نموذج الدم في الظلام بعيداً عن ضوء الشمس او الضوء الاصطناعي حتى يتجلط الدم ثم يفصل المصل باستخدام جهاز الطرد المركزي . ومن الضروري التأكد من عدم وجود اية آثار لتحلل الكريات الدم الحمراء بنموذج المصل .

خطوات العمل :

(أ) البليروبين الكلي :

جهز انابيب (مزدوجة) لكل من النموذج تحت الفحص والكفيء (blank) .

- اضف بماصة الى كل انبوب (3.6) مللي لتر من الماء المقطر (0.4) مللي لتر من مصل الدم واخلط جيداً .
- ثم أضف الى الكفيء (1) مللي لتر من كفيء الدايزو (حيث التحضير كما هو تحت المحاليل) وأخلط جيداً .
- وأضف الى أنبوب النموذج (1) مللي لتر من كاشف الدايزو .
- بعد ذلك أضف الى جميع الانابيب :

(5) مللي لتر كحول المثيل . واخلط بهدوء مع تجنب ظهور فقاعات ، اترك الانابيب في الظلام لمدة (30) دقيقة وأقرأ اللون الناتج خلال العشر الدقائق التالية عند الموجة الضوئية

(540 mu) او مستعملاً مرشح اصفر - مخضر ويتم قراءة جميع الانابيب بالمقارنة مع الماء .

هيء محلول قياسي مستخدماً مادة البيلروبين او محلول قياسي غير حقيقي (اي صناعي (artificial) مستخدماً كاشف المثيل الاحمر (انظر تحت المحاليل) والذي تتم قراءته في نفس الوقت مع النموذج بالمقارنة ايضاً بالماء .

(ب) في حالة تقدير البيليروبين المباشر يستبدل 5 مللي لتر كحول المثيل بـ 5 مللي لتر ماء مقطر في النموذج والكفيء فقط . ولا يستخدم الماء المقطر في الانبوب القياسي .

انبوب سيطرة :

يحتوي هذا الانبوب على مصل دم ذو تركيز معلوم من البيليروبين ويجري هذا الانبوب مع كل وجبة فحوصات ويعامل كالنموذج تحت الفحص تماماً (انظر تحت المحاليل) .

جدول (6) طريقة عمل تقدير البليروبين الكلي المباشر والغير مباشر

المحلول	النموذج (الكلي)	النموذج (المباشر)	الكفىء	القياس
ماء مقطر	3.6	3.6	3.6	3.6
مصل الدم	0.4	0.4	0.4	—
محلول قياسي	—	—	—	0.4
كفيء كاشف اليازو	—	—	1	—
كاشف الديازو	1	1	—	1
كحول المثيل	5	0	0	5
ماء مقطر	—	5	5	—
	أخلط جيداً مع عدم حدوث فقاعات			
	هوائية وأترك الانابيب في الظلام			
	لمدة 20 دقيقة وأقرأ اللون عند			
	الموجة 540 mᵐ مع ضبط الجهاز			
	على الصفر بالماء المقطر .			

ثم طبق طريقة الحساب الموضحة في التجربة

* الحجوم الموضحة في الجدول بالمللي لتر

البيلروبين الغير مباشر = الكلي – المباشر

ملاحظة : في تقدير البيليروبين المباشر يستبدل 5 مللي لتر الكحول المثيلي بـ 5 مللي لتر ماء مقطر . في النموذج والكفىء فقط . ولا يستخدم الماء المقطر في الانبوب القياسي .

الحساب :

باستعمال محلول قياسي غير حقيقي (صناعي) $\frac{ص - ب}{س}$ × (أ) = ملغرام مجموع البيلروبين/(100) مللي لتر مصل .

حيث (أ) البيلروبين المناظرة لتركيز المحلول القياسي الغير الحقيقي بالمللغرام/ (100) مللي لتر والتي يتم تعيينها مع محلول قياسي حقيقي يحتوي على كمية محددة من بيلروبين والذي عومل بنفس الطريقة اعلاه عموماً أ = 8
ص = الكثافة الضوئية للفحص .
ب = الكثافة الضوئية للكفيء .
س = الكثافة الضوئية للمحلول القياسي الغير الحقيقي .
وللتحويل الى وحدات دولية µmol/L تضرب بالمعامل 17 .

المحاليل :

1 - كاشف الديازو (diazo–reagent) يحضر قبل الاستعمال مباشرة بمزج (10) مللي لتر من المحلول (أ) (0.3) مللي لتر من المحلول (ب) .

محلول (أ) :

(1) غرام من حامض السلفانيلك (15) مللي لتر من حامض الهيدروكلوريك المركز لكل لتر ماء مقطر يحفظ هذا المحلول بدرجات الحرارة الاعتيادية الى ما لانهاية .

محلول (ب) :

(0.5) غرام نتريت الصوديوم لكل (100) مللي لتر ماء يجب حفظ هذا المحلول بالثلاجة عند درجة 4م ويحضر كل 3 شهور . وان الرائحة المميزة لكاشف الدايزو عند خلطه طازجاً يشير الى ان محلول النتريت لم يتحلل ولم يفسد بعد .

كفيء الدايزو : (diazo–blank)

(15) مللي لتر من حامض الهيدروكلوريك المركز لكل (1000) مللي لتر من الماء المقطر .

المحلول القياسي الغير الحقيقي او الصناعي المخزن (stock–artificial–standard)

290 mg احمر المثيل (methyl–red) لكل (100) مللي لتر من حامض الخليك الجليدي .

المحلول القياسي الصناعي للتشغيل : (working-artifcial-standard)

(1) مللي لتر من محلول احمر مثيلي المركز المخزون يضاف اليه (5) مللي لتر من حامض الخليك الجليدي . (14.4) غرام من خلات الصوديوم المائية ويكمل الحجم الى لتر بالماء المقطر . هذا المحلول جاهز للاستعمال فورا . ويجب معايرة هذا المحلول القياس الجاهز للتشغيل مع محلول قياسي من البيلروبين باتباع الطريقة التي سبق شرحها ويجب ان يتم ذلك بصفة دورية على فترات كما يجب تحضير قياسي جديد اذا انخفضت القراءة كما يجب التأكد من صحة ذلك باستخدام مصل قياسي ذو تركيز معلوم من البيلروبين .

نموذج السيطرة : (من الامصال المخلوطة (pooled serum))

يمكن حفظ وخلط بقايا المصل لمدة ايام وتقدير محتواها من البيلروبين بالمقارنة بمحلول قياسي من البيلروبين . ثم تجزأ الامصال المخلوطة الى اجزاء صغيرة الحجم وتجمد وتحفظ حيث يمكن اعتبار البيلروبين في هذا المصل تحت هذه الظروف ثابتا لمدة اقصاها شهرا وبذا يمكن استخدامها كنماذج للسيطرة في عديد من التجارب .

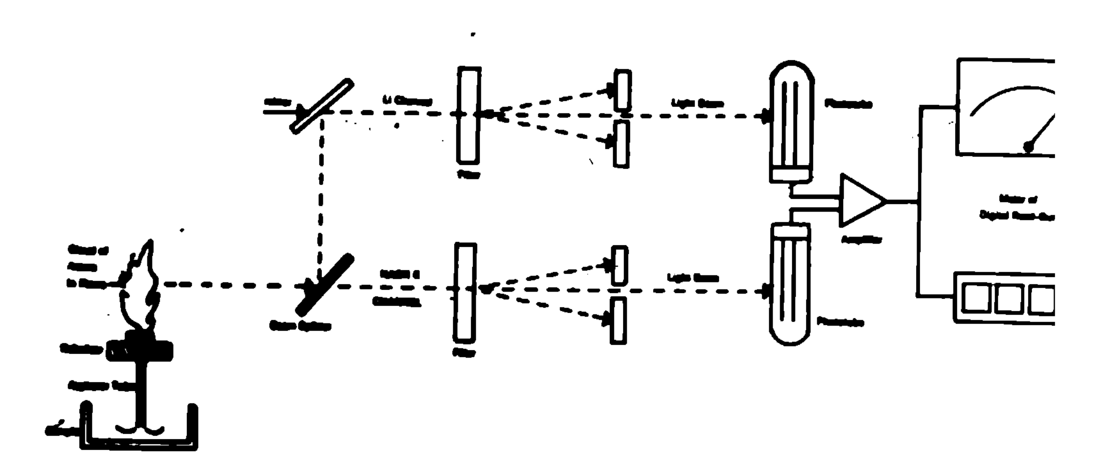
الفصل الثالث

شوارد مصل الدم (الصوديوم - البوتاسيوم - الكلوريد) - الكالسيوم - الفوسفور - الهيموجلوبين - حديد مصل الدم والسعة الكلية والغير مشبعة للارتباط بالحديد ونسبة تشبع الترانسفرين .

شوارد مصل الدم (Serum electrolytes)

(Atomic absorption spectrophotometry and flame emission)

ان افضل الطرق لتقدير المعادن التي توجد في السوائل البيولوجية تعتمد على انبعاث (emission) في اللهب او على الامتصاص الذري الطيفي وتعتمد كلا الطريقتين على التغير في الطاقة عند تبخير هذه المعادن . في طريقة الانبعاث في اللهب يتم رش محلول يحتوي على ايونات المعدن في لهب ذو درجة حرارة عالية فتكسب ايونات المعدن طاقة تجعلها تشع ضوء ذو صفات مميزة ، فالصوديوم يميز باعطاء لون اصفر ذهبي (golden yellow) ويعطي البوتاسيوم لون بنفسجي ، يعطي الليثيوم لون احمر ، ويعطي الكالسيوم لون احمر طوبي (brick-red colour) وتتناسب شدة اللون مع كمية العنصر ويمثل الشكل الاتي مخطط للنظام العام لاجهزة قياس الوان المعادن في اللهب .



رسم توضيحي لمكونات جهاز قياس الوان المعادن في اللهب (flame photometry) ويتم الحصول على رذاذ دقيق للمحلول بطريقتين : (أ) يتم مزج غازات الاشتعال مع المحلول المحتوي على العنصر في غرفة خاصة قبل ارسال الخليط الى اللهب حيث يصل اليه الرذاذ الدقيق فقط ولاتصل النقيطات الكبيرة (largr droplets) ويستخدم لهذا الغرض ما يعرف بـ (premix nebulizer) .

(ب) هناك نوع اخر يعرف بـ (total consuption nebulizer) وفيه يمر كل النموذج الى اللهب مباشرة ولاتمزج غازات الاشتعال مع المحلول قبل الدخول في اللهب ومن ثم فان درجة حرارة اللهب تكون اعلى وبذا تزداد حساسية ودقة الجهاز وان كان تذبذب القراءات شديد وبذا يفضل النوع الاول في (أ) . وتعرف هذه الظاهرة وهي تحول المحلول الى رذاذ مع حدوث سحابة

(cloud) من ذرات المعدن بعملية (atomization) . ومن الغازات المستخدمة للحصول على اللهب : الاسيتيلين ـ البروبان ـ الميثان والحرارة الناتجة من احتراق هذه الغازات تقل تدريجيا تبع ترتيب هذه الغازات . والغازات التي تعطي حرارة اعلى هي الافضل حيث ان ذلك يؤدي الى زيادة تهيج الجزيئات ومن ثم تزداد شدة الضوء المشع وبالتالي تزداد حساسية ودقة العمل في قياس كميات صغيرة من المعدن .

وان كان هناك احتمال لان تشع عناصرا اخرى عند الحرارة العالية مما يؤثر على النتيجة . ويسقط الضوء المشع على مرشحات ضوئية او على احادي الصبغة (monochromator) حيث يتم نشر الضوء (dispersion) وأختيار ذلك الضوء ذو الطول الموجي المعين والذي يمر من خلال فتحة دقيقة (fine-slit) ويسقط على خلية ضوئية ليحول الى تيار كهربائي يمكن قياسه وان كمية التيار تتناسب مع كمية الضوء وبالتالي مع تركيز المعدن في النموذج تحت الفحص .

في طريقة الامتصاص الذري يتم تنشيط سحابة من ذرات المعدن بواسطة شعاع ضوئي حيث يزال او يمتص بعض الطاقة الضوئية وهذا هو اهم فرق بين الطريقتين ففي الانبعاث في اللهب يتم قياس الضوء المنبعث من ذرات المعدن المهيج (excited) في حين ان في الامتصاص الذري يعتمد على امتصاص الضوء لذرات المعدن في حالة مستقرة . وتختار الطريقة تبعا لنوع وخصائص المعدن :(أ) فالمعادن مثل الصوديوم والبوتاسيوم التي يمكن ان تنشط (atomized and energized) في اللهب من المفضل استخدام طريقة قياس تركيزها بالانبعاث في اللهب . (ب) ولكن المعادن مثل الزنك والنحاس التي يمكن ان يتم لها (atomization) مع عدم تنشيطها طاقيا (not-energized) باللهب فان طريقة الامتصاص الذري هي اذن المختارة والمفضلة والتي يستخدم فيها طاقة عالية مصدرها مصابيح الكاثود المفرغة (hollow cathode lamps) ، ويكون المعدن تحت الفحص القطب السالب في هذه المصابيح وبذا فان هذه المصابيح تنتج ضوء مميز لهذا المعدن . عند توجيه تيار عالي (600-1000 فولت) يتأين الغاز الخامل (inert gas) الذي يملأ المصباح وتصطدم ايوناته بالقطب السالب للمصباح حيث يلفظ (sputter) ايونات المعدن مكونا سحابة من الذرات ذات طاقة عالية وعندما تعود الى حالتها المستقرة ينبعث منها طاقة ضوئية . والاخير هو منشأ الشعاع الضوئي المنتج من مصباح الكاثود المفرغ . وعند مرور هذه الطاقة الضوئية بسحابة ذرات المعدن الغير منشطة فان الذرات الاخيرة تمتص جزء من هذه الطاقة الضوئية وتنشط ويمكن قياس انبعاثها طبقا لما تم وصفه في جهاز قياس الانبعاث في اللهب .

ملحوظة

يمكن احداث عملية (atomization) في جهاز الامتصاص الذري الطيفي باستخدام اللهب او بدونه . في حالة الاخير تتم عملية (atomization) بتسخين النموذج في كأس يمكن تسخينه لدرجات حرارية عالية باستخدام تيار كهربائي ذو فولت عالي مناسب . ان مادة الكأس قد تكون من الكربون أ ، الجرافيت أ ، تانتالوم (tantalum) ويتم التسخين بالتدريج حيث يتم تخفيف النموذج عند درجات الحرارة المنخفضة ثم تتحول الى رماد (ash) عند درجات الحرارة المتوسطة ثم تتم عملية (atomization) عند درجات الحرارة المرتفعة . وخلال هذه العملية يتم توجيه تيار من غاز خامل الى الكأس حتى لايحترق . في بعض الاجهزة يستخدم نظام نصف لهبي (semi-flameless) حيث يسخن الكأس بلهب بدلاً من تيار كهربائي وكمثال لتطبيق هذه الطريقة تقدير الرصاص في الدم حيث يستخدم كأس من النيكل (nickel Delves cup) توضع به كمية من الدم وتخفف على سطح ساخن (hot plate) ثم يوضع في الجهاز ويسخن باللهب لتتم عملية (atomization) .

يقصد بالشوارد (electrolytes) المواد التي تكون او توجد على صورة آيونات (جسيمات مشحونة عند ذوبانها في الماء وكمثال لذلك كلوريد الصوديوم والذي يعطي ايونات الصوديوم (Na+) وآيونات الكلوريد (CL-) في الماء وتسمى آيونات الصوديوم أو أية آيونات موجبة أخرى بالكاتيونات (cations) لانها تنجذب نحو القطب السالب (cathode) في حين ان آيونات الكلوريد او أية آيونات سالبة اخرى تسمى انيونات (anions) لأنها تنجذب نحو القطب الموجب (anode) . وفي الكيمياء السريرية يستخدم أسم الشوارد للدلالة على الصوديوم البوتاسيوم والكلوريد والبيكاربونات .

وفيما يلي بيان تراكيزها في مصل الدم وسائل النخاع الشوكي والبول .

الشوارد	مصل الدم (مللي مكافىء/اللتر)	سائل النخاع الشوكي (مللي مكافىء/اللتر)	البول (ملل مكافىء/24 ساعة)
الصوديوم	(146–138)	(150–142)	(200–75)
البوتاسيوم	(5–3 . 8)	(3.4–2.2)	(80–40)
الكلوريد	(108–100)	(130–120)	(200–75)
البيكاربونات	(30–40)	(28–25)	لا يوجد

ان هناك تعادل بين شوارد سوائل الجسم اي ان تركيز الكاتيونات يعادل تركيز الانيونات كما هو موضح في الجدول التالي :

الكاتيونات	التركيز (مللي مكافىء/اللتر)	الانيونات	التركيز (مللي مكافىء/اللتر)
(Na^+)	(143)	(Cl^-)	(104)
(k^+)	(4.5)	(HCO_3^-)	(29)
(Ca^+)	(5.0)	(proteins)	(16)
(Mg^{++})	(2.5)	(HPO_4^{--})	(2)
	——	(SO_4^{--})	(1)
المجموع	(155)	(organic acids)	(3)
		المجموع	((155)

التغيرات التي تحدث في شوارد سوائل الجسم نوعان :-

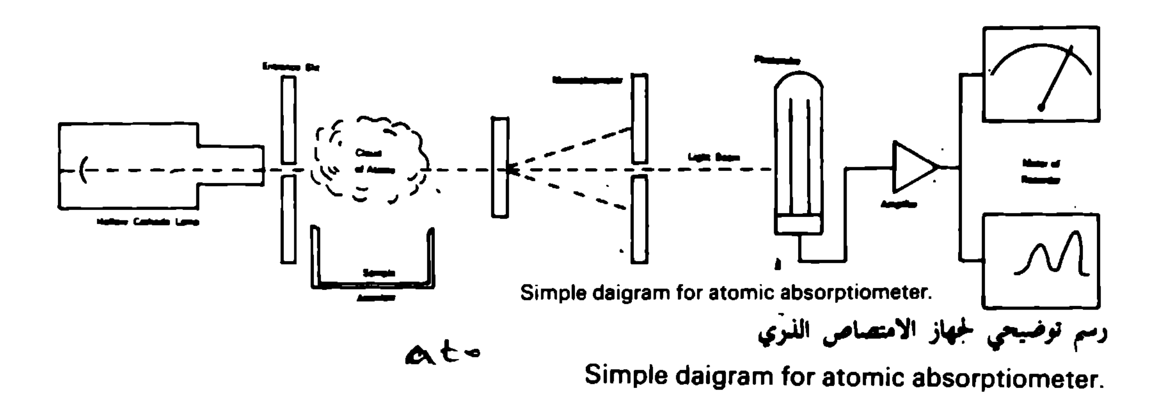
(أ) في النوع الاول تزداد جميع الشوارد (مخط التوتر hypertonic) عن (155) او تقل جميع الشوارد (انخفاض التوتر hypotonic) عن (155) ولكن مع المحافظة على التعادل الكهربائي بمعنى انه الكاتيونات تعادل في تركيزها الانيونات .

ب) في النوع الثاني يزداد تركيز او ينخفض تركيز نوع معين من شوارد سوائل الجسم كمثال يزداد تركيز الكلوريد (5) مللي مكافيء وينخفض تركيز البيكربونات (5) مللي مكافيء وبذا يظل التركيز الكلي للشوارد (155) مللي مكافيء ويساعد تقدير الشوارد في سوائل الجسم معرفة التغير الذي يحدث بها أو للمساعدة في تشخيص حالة مرضية . ويبين الجدول التالي تغير تركيز الشوارد في بعض الحالات المرضية عند الانسان .

الحالة المرضية	تراكيز الشوارد في مصل الدم			
	(Na)	(K)	(HCO_3)	(CL)
الجفاف	ع	ط	ط او م	ع
الاسهال	م	م	م	م
هبوط القلب المحتقن (congestive heart failure)	ط او م	ط	ط	م
الانسداد البوابي (pyloric obstruction)	م	م	ع	م
هبوط الكلية الحاد (acute renal failure)	م	ع	م	ع
حماض الداء السكري (diabetic acidosis)	م	ط او ع	م	م
زيادة العرق (excessive sweating)	م	ط	ط	م
الجوع(starvation)	ط	م	م	ط

ع = عالي   ط = طبيعي   م = منخفض

ويجب ان يعلم المحلل ان مجموع $(Cl^-+HCO_3^-)$ يقل عادة (10) مللي مكافىء عن تركيز (Na) في مصل الدم واذا زاد الفرق عن ذلك (اكثر من 15) فان هذا يشير الى زيادة في انيونات اخرى ومن اهمها (1) في حالات البولينا او عطل الكلية مؤدية الى الاحتفاظ بالاحماض المنتجة داخل الجسم والتي قد تكون غير عضوية (الفوسفات ، الكبريتات) او عضوية (احماض امينية) .



رسم توضيحي لجهاز الامتصاص الذري

Simple daigram for atomic absorptiometer.

ويستدل على وجود مثل هذه الحالة بوجود مستوى يوريا مرتفع في الدم ، (2) حماض الداء السكري للاحتفاظ بالاحماض الكيتونية في الدم ويزداد التأكد بوجود مستوى مرتفع للجلوكوز والاسيتون في الدم وظهور الاسيتون في البول ايضا ، (3) بعض حالات التسمم التي تؤدي الى زيادة بعض الاحماض في الدم مثل زيادة حامض الفورميك عند تناول كمية من كحول المثيل .

وفيما يلي نبذة عن تقدير الصوديوم والبوتاسيوم باستخدام جهاز قياس الضوء باللهب .

الصوديوم :

يوجد معظم الصوديوم في بلازما الدم وهناك قليل جدا منه في الكريات الحمراء تتراوح قيم صوديوم البلازما في الاشخاص الاصحاء ما بين (137–148) مللي مكافىء/اللتر . ويتم الكشف على قيم منخفضة جدا في الحالات الحادة من مرض (Addison) وفي الحالات المزمنة قد يكون الانخفاض قليلا ومن جهة اخرى ففي الحالات التي يصاحبها فقدان السوائل الموجودة خارج الخلايا (extracellular) . تؤدي الى فقدان كمية كبيرة من الاملاح وهذه تؤدي بدورها الى ظهور قيم منخفضة من الصوديوم في البلازما ويتفاقم هذا الانخفاض اذا تم تعويض الماء المفقود بدون التعويض للاملاح التي فقدها الجسم . هناك هبوط غير نوعي (non–specific) في قيم الصوديوم في البلازما (الى حوالي 130–135) مللي مكافىء/اللتر وهذا يصاحب كثير من الامراض المزمنة وقد يكون الهبوط اكبر في الحالات النهائية (terminal stages) عند تقدير الصوديوم باستخدام ضوء اللهب يتم تخفيف البلازما بالماء المقطر بنسبة (1: 100) ونقارن القياسات مع تلك التي نحصل عليها باستخدام محاليل قياسية من كلوريد الصوديوم .

ان طول الموجة للاشعاع الناتج من احتراق الصوديوم في اللهب هو (589–590) مللي ميكرون (اصفر مخضر) .

طريقة العمل :

خفف (0.2) مللي لتر في المصل او البلازما مع (19.8) مللي لتر في الماء المقطر نسبة التخفيف تساوي (100,1) . غطي الانبوب بغشاء بارفين (parafilm) واخلط بالقلب . ضع في الجهاز المرشح الضوء للصوديوم (sodium light filter) وشغل ضوء الجلفانومتر . افتح الغاز كاملا واشعل اللهب ، وافتح تجهيز الهواء ، نظم ضغط الهواء الى (10–16) باون/انج٢ ، وضع دورقا من الماء المقطر عند مدخل الرذاذ وقلل تجهيز الغاز بالتدريج ولحين ظهور اللون الازرق الخاص للهب . دع لبعض الدقائق لغرض التسخين ، ضع المحاليل القياسية المختلفة في دوارق صغيرة مرقمة ومعلمة (labelled) وبالمثل ضع النماذج تحت الفحص والمخففة في عدد من الدوارق الاخرى وكذلك حضر بعض الدوارق بالماء المقطر رش الماء المقطر واضبط مقياس الجلفانومتر على نقطة الصفر . بعد ذلك رش محلول صوديوم قياسي مرتفع التركيز (1.6) مللي مكافىء/اللتر ، واضبط حساسية الجهاز الى الانحراف الكامل على المقياس في الجلفانومتر وبعد ذلك ادفعه الى موضع الصفر مرة اخرى مستخدما الماء المقطر . عندئذ فان الجهاز يكون جاهزا للقياس . رش كل محلول قياسي ثم الماء المقطر بالتناوب ولاحظ قراءات الجلفانومتر مع كل محلول قياسي او التي يجب ان تكون موزعة بصورة متساوية تقريبا على المقياس (scale) ، رش

النموذج تحت الفحص المخفف ولاحظ قراءة الجلفانومتر بعد الغسل بالماء اتبع ذلك فورا برش القياسين الاقربين اللذين يعطيان قراءتين اكثر واقل بقليل من المجهول لتجنب انسداد النافورة الدقيقة للمرذه (automizer) من المستحسن قطع سلسلة القراءات بصورة مستمرة وذلك برذ الماء المقطر . وعلى اي حال يجب رش الماء لغسل النافورة قبل غلق الجهاز . غالبا سيكون من الضروري فصل المرذة وغسلها بتركها في محلول منظف واستخدام سلك دقيق بعناية فائقة . في يلي نموذج لطريقة حساب تركيز النموذج المجهول التركيز .

قراءة الاختبار (92) (أ)

قراءة محلول قياسي تركيز (1.3) مللي مكافىء / اللتر (89) (ب)

قراءة محلول قياسي تركيز (1.4)·مللي مكافىء / اللتر (94) (ج)

الفرق بين (أ ، ب) = (3) وحدات قياس ، الفرق بين (ج ، ب) = (5) وحدات قياس التركيز في محلول الاختبار .

$$= (0.1 \times \frac{3}{5} + 1.3)$$

= (1.36) مللي مكافىء/اللتر

التركيز في البلازما (136 = 100* × 1.36) / مللي مكافىء / اللتر

* نسبة التخفيف

البوتاسيوم

يحتوي بلازما الاشخاص الاصحاء على (3.9–5.0) مللي مكافىء / اللتر وهي قيمة ثابتة الى حد كبير بحيث نشاهد ارتفاع كبير في حالة مرض (Addison) وعندما يكون الادرار محدود (oliguria) بسبب مرض كلوي مزمن متقدم ونحصل على قيم منخفضة في نوبات الشلل الدوري (periodic paralysis) وفي الغيبوبة عند مرض السكر بعد اعطاء الانسولين وفي حالات فقدان البوتاسيوم المسببة غالبا بفقدان الافرازات المعوية المعديه (gastro – intestinal secretions) . غالبا ما يسبب انخفاض لتركيز البوتاسيوم في البلازما الى تحول في الشوارد مع حدوث قلوية مستمرة والتي يمكن ازالتها والعودة بالتركيز والتوازن بين الشوارد الى حالته الطبيعية باعطاء البوتاسيوم وتعويض المفقود منه .

ويتم تخفيف البلازما بنفس المقدار المشار اليه عند تعيين الصوديوم .

ان تركيز البوتاسيوم الناتج يكون اقل من الاوفق غير انه من الملائم اجراء التقدير لكل من الفلزين بنفس النموذج المخفف وان اللون الناتج من احتراق البوتاسيوم في اللهب هو اللون البنفسجي (Violet) ويمكن تقديره عند طول موجي (765–770) (منطقة الطيف الاحمر) .

طريقة العمل :

خفف (0.2) مللي لتر من المصل والبلازما بواسطة (19,8) مللي لتر من الماء المقطر . جهز الجهاز بمرشح الضوء للبوتاسيوم (pottasium light filter) وشغل الجهاز كما سبق الشرح تحت الصوديوم . ان اعلى تركيز قياسي لمحاليل البوتاسيوم القياسية هو (0.8) مللي مكافىء/ اللتر وهي تؤدي الى انحراف المقياس الى ما يقرب من النهاية في الجلفانومتر . واتبع نفس طريقة التشغيل والحساب كما هي تحت الصوديوم .

الماء المقطر المستخدم :

ان الماء المقطر يمكن ان يكون مصدر الخطأ ولذلك فيجب ان يكون الماء المقطر المستخدم خاليا تماما من آثار اية فلزات او معادن وذلك باستخدام الراتنجات المبادلة للآيونات (ion – exchange resins) للحصول على ماء مقطر خالي من الايونات (ion – free – water) وهذه تستخدم للتخفيف وغسل الاوعية الزجاجية ورش الجهاز للتنظيف وازالة آثار محاليل المصل المخففة منه .

محلول الصوديوم القياسي المخزن (stock standard sodium chloride)

{(200) ملي مكافيء في اللتر} أذب (11.69) غرام كلوريـد الصوديـوم النقي الجـاف بـاللتر من الماء المقطر .

محلول البوتاسيوم القياسي المخزن : (Stock standard sodium chloride)

(prepared as a solution of KCL)

{(10) ملي مكافيء/اللتر} اذب (0.746) غرام من كلوريد البوتاسيوم النقي الجاف بـاللتر من الماء المقطر .

المحاليل القياسية للتشغيل : (working standard solutions)

من المستحسن تحضير محاليل قياسية مشتركة (combined) يمكن استخدامهـا لتقـدير اي من المعدنين مع التأكد من استخدام المرشح الضوئي المناسبة لكل معدن .

جهز المحاليل القياسية للتشغيل كما يلي مع اكال الحجم في كل حالة الى لتر بالماء المقطر .

حجم محلول الصوديوم المخزن	حجم محلول البوتاسيوم المخزن	تركيز الصوديوم مللي مكافيء/التر	تركيز البوتاسيوم مللي مكافيء/التر
5.5	2	1.1	0.02
6.0	3	1.2	0.03
6.5	4	1.3	0.04
7.0	5	1.4	0.05
7.5	6	1.5	0.06
8.0	7	1.6	0.07
8.5	8	1.7	0.08

كلوريد البلازما :

نبذة عامة : الكلوريد من الشوارد التي توجد في البلازما ولتحقيق ميزان الشوارد في البلازما يتعين تقدير الكلوريد بمعية الشوارد الاخرى . ان حاصل مجموع تراكيز الصوديوم والبوتاسيوم*(مللي مكافيء / ليتر) يزيد عادة بعشرين عن حاصل مجموع الكلوريد والبيكربونات في البلازما او المصل وقد ترتفع البيكربونات في بعض الحالات المرضية وهو ما يحدث في القلاء الايضي (metabolic alkalosis) تحتوي بلازما الاشخاص الاعتياديين على 99–108 مللي مكافيء من الكلوريد في اللتر . ويحدث انخفاض في مستوى الكلوريد في بلازما الدم في حالات التقيؤ المستمر (prolong Vomiting) والانسداد البوابي (pyloric obstruction) وحالات اليوريميا والاغماء الناتج عن داء السكر . كما وان الاسهال المعوي الحاد قد يؤدي نتيجة لفقدان جزء كبير من العصارة المعوية الى انخفاض شديد في مستوى الكلوريد بمصل الدم وخاصة عند الاطفال في اشهر الصيف وعند الكبار في حالات التهاب القولون التقرحي (ulcerative colitis) والكوليرا (cholera) ومن جهة اخرى فانه يتم فقدان بعض الكلوريد في البول في حالة زيادة الادرار (polyuria) في حالة التهاب الكلية المزمن المتقدم (advanced chronic nephritis) ومرض البول السكري . وكما انه يلاحظ انخفاض مستوى الكلوريد في بلازما الدم عند المرضى المصابون بـ (Addisons disease) اما ارتفاع الكلوريد تشاهد غالبا في حالة الانكاز (dehydration) .

ومن الاحتياطات الواجب اتباعها عند تقدير الكلوريد في بلازما الدم انه يجب فصل البلازما من الدم فورا وتقدير كمية الكلوريد بأسرع وقت وذلك لتجنب تحول الكلوريد عن كريات الدم الى البلازما بسبب فقدان ثاني اوكسيد الكاربون عند تعرض النوذج لفترة في الجو .

الطريقة الاولى لتعيين الكلوريد في بلازما الدم :

تعتمد الطريقة على التفاعل التالي :

$$(NaCL + AgIO_3 \longrightarrow AgCL + NaIO_3)$$

يتم اضافة ايودات الفضة في محلول نوشادري الى كمية مقاسة من البلازما يتم بعد ذلك ترسيب البروتينات وايودات الفضة الزائدة وكذلك كلوريد الفضة الذي نشأ عن تفاعل الكلوريد الموجود في بلازما الدم مع ايونات الفضة عن طريق اضافة خليط من حامض التنجستيك وحامض الفسفوريك . ويبقى في المحلول كمية الايودات الذائبة والتي تعادل كمية الكلوريد الموجودة اصلا في النوذج المستخدم . وعند اضافة كمية من ايوديد البوتاسيوم تتحرر

من الايودات الذائبة كمية من اليود والتي يمكن تقديرها بالتسحيح مستخدما ثيوكبريتات الصوديوم .

طريقة العمل :

اخلط (0.2) مللي لتر من البلازما مع (0.5) من الكاشف ايودات الفضة . ثم اضف (3.3) مللي لتر من حامض الفسفو تنجستيك وامزج جيدا ثم رشح خلال ورقة ترشيح صغيرة دقيقة الثقوب (Whatman No.42.7 cm) حتى لايترسب الراسب الغروي مع الراشح . خذ (1) مللي لتر من الراشح واضف اليه (1) مللي لتر من يوديد البوتاسيوم تركيز (2%) وسحح اليود المتحرر مستخدما محلول ثايوكبريتات الصوديوم (0.005) عياري ويجب التنويه بان اضافة محلول النشا المستخدم كمؤشر لمعرفة نهاية التسحيح ويجب ان يتم عندما يصبح لون اليود المتحرر اصفر باهت .

النموذج القياسي :

عالج (0.2) مللي لتر من المحلول القياسي للكلوريد (100 مللي مكافىء/لتر) بنفس الطريقة المذكورة اعلاه المتبعة مع البلازما ما عدا الاستعاضة عن حامض فسفو تنجستيك بحامض الفسفوريك (0.15) مولار . وذلك لان التنجستات سوف لا تترسب لعدم وجود البروتين بالمحلول القياسي ومن ثم فانها ستتفاعل مع ايودات الفضة مثل الكلوريد .

$$\text{كلوريد البلازما (مللي مكافيء/لتر)} = \frac{\text{تسحيح الفحص}}{\text{تسحيح القياسي}} \times (100)$$

المحاليل :

محلول كاشف ايودات الفضة :

(1.8) غرام من ايودات الفضة لكل (100) ملي لتر في محلول امونيا تركيز 1 ع ، يحضر باضافة (58) ملي لتر من محلول الامونيا المركز لكل لتر من الماء المقطر، يبدو ان محلول يودات الفضة ومحلولها النوشادري تتحلل قليلا مع اطلاق ايودات غير ذائبة عند الاحتفاظ بها لفترة طويلة .

ولكي تتغلب على هذه الصعوبة يتم ما يلي : يضاف (5) ملي لتر من الكاشف المخزون (الاصلي) الى (5) ملي لتر من حامض الكبريتيك العياري فوراً وقبل البدء بسلسلة من الفحوصات ثم شغل في جهاز الطرد المركزي واهمل السائل العلوي وأذب الايودات المترسبة في (5) ملي لتر من محلول النوشادر (0.3) عياري واستخدام في الحال .

حامض التنجستيك ـ فوسفوريك (tungestic – phosphoric acid)

اذب (4.2) غرام من تنكستات الصوديوم ($Na_2Wo_4.2H_2O$) في لتر من محلول (0.15) مولار من حامض الفوسفوريك .

حامض الفوسفريك : (0.15 M)

(10) ملي لتر من حامض الفوسفوريك المركز ، الكثافة النوعية (1.72)، لكل لتر من الماء المقطر .

محلول النوشادر (0.3) عياري :

اضف (17) ملي لتر من محلول النوشادر المركز ،الكثافة النوعية (0.88) ، الى كمية من الماء واكمل الى لتر من الماء المقطر ويعاير بالتسحيح مع حامض قياسي .

محلول الكلوريد القياسي : (تركيز (100) ملي مكافىء / اللتر)

اذب (585) ملي غرام من كلوريد الصوديوم النقي في كمية من الماء واكمل الى (100) ملي لتر بالماء المقطر .

الطريقة الثانية لتقدير الكلوريد في بلازما الدم :

عندما يضاف محلول نترات الزئبقيك الى محلول الكلوريد فانه يتكون كلوريد الزئبقيك غير المتأين وعند نقطة التعادل فان الزيادة الاولى لآيونات الزئبقيك تعطي لونا بنفسجيا فاتحا مع المؤشر (indicator) ثنائي فينيل كاربازون (diphenyl carbazone) وتتم المعايرة مباشرة على المصل المخفف ولكن في نماذج المصل الملونة كما هو الحال في مرض اليرقان (jaundice) ، فمن الضروري ترسيب البروتين بحامض التنجستيك واتمام المعايرة على الرشيح (Folin - Wu - tungstate filtrate) ويمكن تطبيق نفس الطريقة في تقدير كلوريد نماذج البول والسائل النخاعي (urine and cerebrospinal fluid) .

جمع نماذج الدم

اسحب حوالى (5) مللي لتر من الدم . يسبب الكراب (torniquete) انخفاضا في البيكربونات وينتقل الكلوريد من البلازما الى كريات الدم الحمراء) ولذلك فعند سحب الدم استعمل كرب خفيف واسحب الدم فورا) .

ويجب الحصول على المصل خلال ثلاثين دقيقة من بعد سحب الدم (حيث ان اطالة الزمن يؤدي الى تسرب البيكربونات والكلوريد من الكريات الحمراء الى البلازما) كما يجب ان يكون فصل الخلايا من البلازما تماماً وبدون حلل لكريات الدم الحمراء حيث ان الاخيرة تحتوي على الكلوريد وان كان بكميات تقل كثيرا عن المصل .

طريقة العمل :

أ - على نموذج المصل مباشرة

1 - ضع (2) مللي لتر من الماء المقطر في دورق مخروطي صغير .

2 - حول بماصة (0.2) مللي لتر من المصل الى الدورق المخروطي واخلطه جيدا مع كمية من الماء المقطر .

3 - اضف (4) قطرات من محلول المؤشر ثنائي فينيل كاربازون .

4 - عاير مع نترات الزئبقيك مستعملاً سحاحة دقيقة الحجم (2) مللي لتر مضيفا بكميات صغيرة في حدود (0.01) مللي لتر مكعب وحتى نقطة التعادل .

ويستدل على نقطة التعادل بظهور لون بنفسجي فاتح .

ب - على رشح المصل والخالي من البروتينات :

1 - اخلط جيدا (0.5) مللي لتر من المصل مع (4) مللي لتر من حامض الكبريتيك تركيز (1/12) عياري .
2 - اضف (0.5) مللي لتر من المحلول تنكستات الصوديوم واخلط جيدا (لترسيب البروتينات) .
3 - رشح الخليط وكرر عملية الترشيح في حالة ما اذا كان الرشيح ضبابي او عكر (turbid or cloudy) .
4 - خذ (2) مللي لتر من الترشيح «والذي يعادل (0.2) مللي لتر من المصل» في قارورة وعاير مستخدما نترات الزئبقيك والمؤشر كما في حالة المصل اعلاه .

النموذج القياسي :

(2) مللي لتر من محلول الكلوريد «كلوريد الصوديوم القياسي بتركيز (10) مللي مكافيء / اللتر» وعاير بدورق مخروطي كما في حالة نموذج المصل (أ) .

حساب تركيز الكلوريد في مصل الدم :

$$\text{تركيز الكلوريد في المصل} = \frac{\text{سم}^3\ \text{المستخدم في معايرة الاختبار}}{\text{سم}^3\ \text{المستخدم في معايرة المحلول القياسي}} \times (100) = \text{مللي مكافيء/لتر}$$

القيم الطبيعية في مصل الدم عند الاصحاء :

(108–99) مللي مكافىء من الكلوريد / اللتر .
وللتحويل الى وحدات دولية mmol/L أضرب بالمعامل (1) .

تقدير الكلوريد في الادرار :

يعامل الادرار مثل المصل ويمكن استخدام من (1.0–0.2) مللي لتر من البول اعتمادا على كمية الكلوريد المتوقعة به .

حساب الكلوريد في نموذج من الادرار :

اذا ما استخدمنا (0.2) مللي لتر من الادرار تطبق نفس طريقة الحساب المذكور اعلاه تحت مصل الدم .

اما اذا استخدمنا حجما من البول يزيد على (0.2) مللي لتر فيضرب الناتج في معامل تتوقف قيمته على كمية البول المستخدمة في الاختبار فمثلا اذا استخدمنا (1) مللي لتر من الادرار يصبح المعامل (0.2 / 1.0) وفي حالة تقدير الكلوريد في الادرار غالبا ما تسجل النتيجة بالمكافىء كلوريد في ادرار 24 ساعة وفي هذه الحالة يجري الاختبار على نموذج من الادرار المجمع خلال 24 ساعة بعد مزجه جيدا وتقاس كمية الادرار الكلي في 24 ساعة ويتم حساب تركيز الكلوريد في النموذج كما يلي :

حساب الكلوريد في ادرار 24 ساعة .

$$\frac{\text{تركيز الكلوريد في الادرار مللي مكافىء / اللتر} \times \text{كمية الادرار خلال 24 ساعة بالمليلترات}}{1000}$$

معايرة برمنكنات البوتاسيوم وحامض اوكساليك

في وجود عامل مختزل مناسب وحامض الكبريتيك تقوم برمنكنات البوتاسيوم كعامل مؤكسد وذلك طبقا للمعادلة التالية :

$(2KMnO_4 + 3H_2SO_4 \longrightarrow K_2SO_4 + 2MnSO_4 + 3H_2O + 5O)$ وبرمنكنات البوتاسيوم تختزل بواسطة المواد العضوية الموجودة في الماء كما ان محلولها يتحلل تحت تأثير الضوء . ولذا يجب حفظ المحلول في مكان مظلم بعيدا عن الضوء المباشرة .

وان يعاير من فترة الى اخرى لمعرفة مدى تغير تركيزه قبل استعماله .

ولمعايرة محلول حامض الاوكساليك بواسطة برمنكنات البوتاسيوم تتبع الخطوات الآتية :

ضع (10) مللي لتر من محلول حامض الاوكساليك في قارورة مخروطية (Erlenmyer flask) واضف (10) مللي لتر من محلول الكبريتيك تركيز (1 ع) وكذلك (5) مللي لتر من الماء المقطر .

سخن المحلول الى حوالي (80)°م ، ثم سحح المحلول وهو ساخن بمحلول برمنغنات البوتاسيوم الذي تم اضافته من السحاحة تدريجيا وبكميات صغيرة مع الرج وحتى تؤدي نقطة

واحدة الى ظهور لون وردي ثابت لمدة لا تقل عن دقيقتين وتعتبر هذه هي نقطة النهاية مؤشرا بذلك الى اتمام المعايرة .

وهناك عدة ملاحظات يجب اتباعها بدقة وهي :

1 - يجب عدم تسخين المحلول لدرجة حرارة عالية حيث ان ذلك قد يؤدي الى اختزال كمية زائدة من برمنكنات البوتاسيوم وقبل تفاعلها مع حامض الاوكساليك .

2 - ان ظهور تلون أو راسب بني خلال عملية التسحيح انما يدل على عدم وجود كمية كافية ومناسبة من حامض الكبريتيك او ان الحرارة منخفضة وغير كافية لاتمام عملية تفاعل حامض الكبريتيك مع اوكسيد المنغنيز الناتج وعندئذ يجب اما اضافة حامض الكبريتيك او رفع درجة حرارة المزيج المتفاعل اذا ماكانت منخفضة عن 60م وتبين المعادلات التالية مراحل التفاعل المختلفة :

$(2H_2C_2O_4 + 2KMnO_4 + 3H_2SO_4 \longrightarrow K_2SO_4 + 2MnSO_4 + 10CO_2 + 8H_2O)$ ومن هذه المعادلة يتضح ان تكافؤ المنغنيز تغير من (+7) الى (+2) اي فقد (5) الكترونات بما ان الوزن الجزيئي لبرمنكنات البوتاسيوم (158.05)غم .

اذن الوزن المكافىء بالغرامات لبرمنكنات البوتاسيوم (5 / 158.05 = 31.61) غرام/لتر محلول (1) ع* ، الوزن الجزيئي بالغرامات لحامض الاوكساليك (126.05) غرام .

وحيث ان جزء الحامض يحتوي على عدد اثنين ذرة هيدروجين يمكن احلالها بالفلز فان الوزن المكافىء للحامض بالغرامات (2 / 126.05 = 63.025) غرام / لتر *محلول 1 ع* واذا ما استهلكت (8) مللي لتر (V_1) من برمنكنات البوتاسيوم ع 1 (N_1) في معايرة (10) مللي لتر (V_2) من محلول حامض اوكساليك غير معلوم العيارية ($N2$) فان عيارية محلول حامض الاوكساليك تحسب طبقا :

$$(V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2)$$

$$(0.1 \times 8 = 10 \times N_2)$$

$$N\ 0.08 = \frac{0.1 \times 8}{10} = N_2$$

ملحوظة :

يجب اجراء التسحيح مرتين على الاقل مع تطابق نتائجهما في حدود (0.1) مللي لتر والا فيجب اجراء قراءة ثالثة لحساب تركيز محلول حامض الاوكساليك .

تقدير الكالسيوم في مصل الدم (Serum calcium)

مقدمة :

يتم امتصاص الكالسيوم من الامعاء الدقيقة ومنها يصل الى الدم ويستعمل الكالسيوم في تكوين العظام والاسنان ويدخل في عملية تجلط الدم . وان هورمون الغدة الجنب الدرقية (Parathyroid gland) له تأثير على مستوى الكالسيوم في البلازما . فان زيادة الهرمون (parathormone) تسبب زيادة في عمليات الهدم (catabolism) واذابة (dissolution) جزء من نسيج العظام ومن ثم يؤدي ذلك الى ارتفاع ملحوظ في مستوى الكالسيوم في البلازما . وبالعكس فان وجود مستوى منخفض للكالسيوم في البلازما سيؤدي الى تحفيز لانتاج هذا الهرمون . ونشاهد قيم منخفضة للكالسيوم في بلازما الدم في حالات مرض التكزز (مرض يظهر بسبب وجود خلل في تمثيل الكالسيوم) ومن اهم اعراض هذا المرض حدوث تشنجات وتقلص (twiching) في العضلات . كما وينخفض الكالسيوم بصفة ثانوية (secondary) . في حالات اسهال البلاد الحارة والمعروفة باسم (sprue) وعند حدوث نقص في نشاط الغدة الجنب درقية وكذلك عند وجود نقص في فيتامين (vit. D) .

الطريقة :

يضاف محلول اوكسالات الامونيوم لترسيب الكالسيوم على شكل اوكسالات الكالسيوم ويفصل الراسب ويغسل بمحلول هيدروكسيد الامونيوم المخفف لازالة الشوائب والكمية الزائدة من اوكسالات الامونيوم وبعد ذلك يضاف حامض الكبريتيك المخفف الى الراسب ليحرر حامض الاوكساليك من اوكسالات الكالسيوم . وعندئذ يمكن تسحيح حامض الاوكساليك الحر بواسطة برمنغنات البوتاسيوم ويستدل على نقطة النهاية بظهور لون وردي فاتح نتيجة لاتمام اكسدة كمية حامض الاوكساليك الموجودة بالمحلول وبقاء اثار قليلة زائدة من برمنغنات البوتاسيوم وهذه الطريقة تقدر كل من الكالسيوم المتأين والكالسيوم المتحد مع البروتينات .

جمع نموذج الدم :

يتم جمع (8–10)مللي لتر من الدم الوريدي ويترك ليتجلط ثم يفصل المصل مع ضرورة تجنب اي اثر لتحلل كريات الدم الحمراء (haemolysis) .

طريقة العمل :

ملحوظة : يتم اجراء انابيب الفحص وانبوب اوكسالات الصوديوم للحصول على المعامل (م) (factor) والسيطرة كل بصورة مزدوجة (duplicate) .

انبوب الفحص : (test)

اضف ما يلي في انبوب المنبذة مخروطي سعة 15 مللي لتر .

(2.0) مللي لتر من مصل الدم .
(1.0) مللي لتر من محلول مشبع من اوكسالات الامونيوم .
(2.0) مللي لتر من الماء المقطر .

اخلط جيدا بهز الطرف السفلي من الانبوبة . واترك الانبوبة في وضع مستقر لمدة (12–24) ساعة لضمان ترسيب كل الكالسيوم الموجود بالنموذج .

انبذة لمدة عشر دقائق عند (3000) لفة في الدقيقة ارفع الانبوبة من جهاز الطرد المركزي وبحركة بطيئة متزنة اقلب انبوب المنبذة وضعها في وضع مقلوب على ورقة ترشيح وذلك لكي يتم التخلص من اثار السوائل مع بقاء الراسب في قاع الانبوبة ثم يغسل الراسب للتخلص من بقايا المواد التي قد تتداخل في الاختبار وتؤثر على النتيجة . وتتم عملية الغسيل باضافة (3) مللي لتر من محلول هيدروكسيد الامونيوم تركيز (2%) على ان تكون الاضافة ببطء وعلى جوانب الانبوبة وليست مباشرة على الراسب . بعد ذلك علق الراسب بطريقة تساعد على تكسيره وانتشاره في محلول هيدروكسيد الامونيوم وذلك بواسطة نقر الجزء السفلي من الانبوبة انبذ لمدة عشرة دقائق عند (3000) لفة في الدقيقة واسكب السائل الطافي مع حركة دورانية مستمرة وبطيئة للانبوبة . كرر غسل الراسب مرة اخرى او مرتين وبعد الحصول على راسب خالي من المواد المتداخلة اضف :-

(2) مللتر من محلول حامض الكبريتيك (1) ع واذب الراسب بنقر الجزء السفلي من الانبوب والتسخين في حمام مائي بدرجة (70–80 C) لبضع دقائق وسحح (اثناء بقاء الانبوب ساخنا عند هذه الدرجة) مع برمنغنات البوتاسيوم (0.01) عياري مستعملا سحاحة دقيقة ومضيفا أجزاء من النقطة قرب نقطة النهاية والتي يتم تأشيرها والتعرف عليها بظهور وبقاء اللون الوردي الفاتح (برمنجنات البوتاسيوم) والذي يستمر لمدة دقيقة واحدة عند حرارة حمام مائي .

معايرة اوكسالات الصوديوم للحصول على المعامل (factor)

حول بماصة في انبوب منبذة :

(2.0) مللي لتر من محلول اوكسالات الصوديوم (0.01) ع .
(2.0) مللي لتر من محلول حامض الكبريتيك (1) ع وضع في حمام مائي عند (70–80م) لبضع دقائق . وسحح كما في الفحص .

السيطرة :

يتم معاملته تماما مثل الفحص مستعملا (2.0) مللي لتر من محلول قياسي يحتوي على (10) مللي غرام من الكالسيوم في كل (100) مللي لتر وذلك بدلا من (2) مللي لتر من مصل الدم .

ملاحظات هامة :

يجب تنظيف الانابيب بمحلول الهيدروكلوريك النقي (2 ع) ثم غسلها جيدا بالماء المقطر .

الحساب :

$$س \times \frac{2}{م} \times (0.2) \times \frac{100}{2.0} = \frac{س \times (20)}{م}$$

= مللي غرام كالسيوم/ (100) مللي لتر من مصل الدم .
وحيث ان س = مللي لتر استعملت في تسحيح الفحص .
(2) = مللي لتر اللازمة لتسحيح العامل اذ كانت برمنغنات البوتاسيوم (0.01) عياري بالضبط .
(0.2) = مللي غرام كالسيوم المعادلة الى (1) مللي لتر من محلول برمنغنات البوتاسيوم (0.01) ع .
(100) = كميةالمصل المعبر عنها بالنتيجة .
(2.0) = كمية المصل المستعملة .
م = مللي لتر اللازمة لتسحيح العامل .

القيم الاعتيادية :

(10 – 11.5) مللي غرام كالسيوم / (100) مللي لتر من مصل الدم .

المحاليل :

محلول اوكسالات الامونيوم المشبع :

(5.8) غرام من اوكسالات الامونيوم $(NH_4)_2C_2O_4.2H_2O$ مذابة في قليل من الماء ويكمل الحجم الى (100) مللي لتر بالماء المقطر .

محلول هيدروكسيد الامونيوم (2%)

خفف (20) ملي لتر من محلول الامونيا المركز (الكثافة النوعية 0.88) الى (100) مللي لتر من الماء المقطر .

محلول حامض الكبريتيك (1) ع :

أضف ببطء مع التحريك (28) مللي لتر من حامض الكبريتيك المركز الى حوالي (900) مللي لتر من الماء المقطر وبرد ثم أكمل الحجم الى لتر مستخدماً الماء المقطر .

محلول برمنغنات البوتاسيوم (0.1) ع

أذب (3.16) غرام برمنغنات البوتاسيوم في الماء المقطر وخفف الى اللتر بالماء المقطر وأحفظ في قنينة بنية بعيداً عن الضوء .

خفف كل (1) مللي لتر الى (10) قبل الاستعمال للحصول على برمنغنات البوتاسيوم (0.01) ع .

محلول أوكسالات الصوديوم (0.1) عياري :

جفف كمية أوكسالات الصوديوم اللامائية في فرن بدرجة حرارة (110)م ولمدة (12) ساعة ثم اتركها لتبرد في مجفف فوق حامض الكبريتيك المركز .

زن (6.7) غرام أوكسالات الصوديوم المجفف وأضف (200) مللي لتر من الماء ثم مع التحريك الجيد أضف (5) مللي لتر من حامض الكبريتيك المركز واستمر في التقليب الى ان يتم ذوبان الاوكسالات ثم خفف الى لتر واحد بالماء المقطر . وقبل الاستعمال خفف بنسبة (10:1) .

المحلول القياسي للكالسيوم :-

{(10) مللي غرام كالسيوم / (100) مللي لتر} اذب(249.7) مللي غرام من كربونات الكالسيوم اللامائية ($CaCO_3$) النقية في (5) مللي لتر من محلول (1) ع حامض الهيدروكلوريك وخفف واكمل الحجم الى اللتر بالماء المقطر .

تقدير الفوسفات في الدم

فسفور الدم :ـ (blood phosphorus)

يمكن تصنيف مركبات الفسفور والتي توجد في الدم والانسجة الى ما يلي :ـ

1 - مركبات فسفور غير عضوية :

مثل فوسفات الفلزات القاعدية والارضية . (Phosphates of alkali and alkaline earth metals) .

2 - مركبات فوسفور عضوية ويطلق عليه ايضا استر فوسفات :

(organic or ester phosphate) وتضم بصورة رئيسية فوسفات الكليسيرول (glycerol) phosphate ، فوسفات النيوكليوتيد ، وفوسفات السكريات السداسية(hexose -phosphate) وغيرها .

3 - فوسفور دهني : (Lipid phosphorus)

ويدخل في تركيب مركبات الدهون الفسفورية مثل سيفالين (cephalin) ، وسيفنكوميلين (sphingomyelin) ليسيثين (lecithin) .

4 - كمية قليلة من الفوسفور ويطلق عليها الفسفور المتبقي او الفوسفور (phosphorus residual) وتتضمن الفوسفور الذي يدخل في تركيب بعض البروتينات والتي تعرف بالبروتينات الفسفورية (phosphoproteins) .

وتشكل كل انواع الفوسفور المشار اليه اعلاه في مجموعها مايعرف الفوسفور الكلي . (total phosphorus) والصنفين الاول والثاني يشكلان مايعرف بالفوسفور الذائب في الوسط الحامض . (acid soluble phosphor)

ويمكن تلخيص القيم الطبيعية لانواع الفوسفور كما يلي :-

نوع الفوسفات	مللي غرام فوسفور /(100) مللي لتر	
	في كل الدم	في البلازما او المصل
فوسفات غير عضوية	(4 - 2)	(4.5 - 2.4)*
فوسفات استر	(30 - 20)	(1.70 - 0.1)*
فوسفات دهن	(14 - 11)	(11 - 6)

* يزداد المعدل عند الاطفال والاولاد الصغار ويصل الى (6) مللي غرام .

وفيما يلي نبذة مختصرة على كل انواع مركبات الفوسفات في الدم :-

1 - الفوسفات الغير عضوية :-

يمكن استخلاص الفوسفات غير العضوية بسهولة من الدم او البلازما والخلايا بواسطة محلول حامض الخليك ثلاثي الكلوريد (trichloro acetic acid) والذي يعمل في نفس الوقت على ترسيب البروتينات وتحطيم فعالية الانزيم الذي لو استمر لعمل على اضافة كمية من الفوسفات الغير العضوية الى الدم عن طريق التحليل المائي للاسترات الفوسفورية وخاصة عندما يسمح للدم بالاستقرار لفترة زمنية طويلة ولهذا السبب فمن الضروري اجراء تقدير الفوسفات غير العضوية خلال ساعة او ساعتين على الاكثر من وقت جمع نموذج الدم . كما انه يجب فصل البلازما فوراً عن الخلايا حيث ان الاخيرة تحتوي على جميع الاسترات الفوسفورية تقريباً . واذا لم يكن بالامكان اجراء التحليل على البلازما المفصولة حديثاً الا بعد عدة ساعات فعليه يتوقع أن يكون قيمة الفوسفات غير العضوية التي نحصل عليها تزيد بحوالي واحد مللي غرام عما لو تم التحليل فوراً .

وذلك لأن هذا المللي غرام يقابل تقريباً كمية الاسترفوسفات والتي توجد اعتيادياً في كل (100) مللي لتر من بلازما الدم .

ويتغير مستوى الفوسفات الغير العضوي في الدم في بعض الحالات المرضية ومنها :-

أ - يزداد معدل الفوسفات الغير عضوية في الدم في حالة التهاب الكلية (acidosis of nephritis) وحالات القنغرينا (gas-gangrene) وقد يصل المعدل الى (10) مللي غرام او اكثر في هذه الحالات .

ب - تظهر معدلات منخفضة للفوسفات الغير العضوي في حالة لين العظام (osteomalacia
ان معدل الفوسفات غيرالعضوية في الدم عند الاطفال اعلى منها عند الكبار لزيادة النشاط
في تكوين او نمو العظام وان معدل الطبيعي عند الاطفال هو (4-6) مللي غرام لكل
(100) مللي لتر من بلازما الدم في حين ان معدله عند الكبار يقع مابين (2.5-4.5
مللي غرام/(100) مللي لتر في بلازما الدم ويقل معدل الفوسفات الغير العضوية عند
الاطفال المصابون بالكساح وتصل التراكيز مابين (1-3) مللي غرام لكل (100) مللي لتر
من بلازما الدم .)

طريقة العمل :-

اساس الطريقة :

تعتمد الطريقة على اتحاد الفوسفات غير العضوية مع حامض الموليبديك لتكون موليبدات الفوسفات الصفراء . وهذه عند اختزالها تعطي لونا ازرق تتناسب شدته مع كمية الفوسفات غير العضوية الموجودة في المحلول . ويلاحظ ان الفوسفات غير قادرة على التفاعل مع حامض الموليبديك الا اذا تم تكسير المادة بالهضم مع حامض فوق الكلوريك (perchloric acid) المركز الحار . وعندما يتم تحويل الفوسفات العضوية بالنموذج الى فوسفات غير عضوية فانها بذلك تتحول الى النوع الذي يتفاعل مع حامض المولبيديك وتكون كمية الفوسفات المقدرة تساوي مجموع الفوسفات الغير عضوية وكذلك العضوية (استرفوسفات) الموجود في مستخلص الدم عند معاملته بحامض الخليك ثلاثي الكلور . وبالطرح (الفوسفات الكلي ـ الفوسفات الغير عضوية) نحصل على الفوسفات العضوية . اي انه يمكن الحصول على فوسفات الاستر بطرح قيمة الفوسفات غير عضوية التي توجد أصلاً بالنموذج من مجموع الفوسفات الذائبة بالحامض .

خطوات العمل :-

أ - **تقدير الفوسفات غير العضوية :** يتم اضافة (1) مللي لتر من بلازما او نموذج الدم الكلي والمسحوب حديثاً الى (9) مللي لتر من محلول حامض الخليك ثلاثي الكلور تركيز (10%) . يتم رج الخليط جيداً ويرشح بعد (5) دقائق . ويتم اجراء تحليل للفوسفات غير العضوية والفوسفات الكلية الذائبة بالحامض على هذا الرشيح .

انبوب النموذج : يتم تحويل (5) مللي لتر من الرشيح الصافي الى انبوبة اختبار (وهذا يقابل (0.5) مللي لتر من بلازما الدم) .

انبوب المحلول القياسي : - يتم وضع (5) مللي لتر من محلول الفوسفات والتي تعادل (0.02) مللي غرام من الفوسفور) في انبوبة اختبار اخرى مشابه لانبوب النموذج .

انبوب الكفيء :

يوضع بانبوب اختبار مشابه (5) مللي لتر من الماء المقطر .

يضاف لكل أنبوب (0.4) حامض الفوق كلوريك ، (0.4) مللي لتر من محلول المولبيدات تركيز (5%) و (0.2) مللي لتر من محلول العامل المختزل ويجب رج محتويات الانابيب بهدوء بعد كل اضافة ثم تخلط محتويات الانبوب او الانابيب جيداً بعد الاضافة الاخيرة وتترك الانابيب في وضع مستقر لمدة عشرة دقائق يقرأ بعدها اللون الازرق الناتج عند الموجة الضوئية (700mu) او مستخدماً مرشح اللون الاحمر (Ilford red light filter No. 608)

جدول (7) تقدير الفوسفات الغير عضوية في مصل الدم أو البلازما

المحلول*	النموذج	الكفىء	القياس
حامض ثلاثي كلور الخليك	9	—	—
المصل او البلازما	1	—	—
	رج جيداً واترك لمدة 5 دقائق ثم ضع في جهاز الطرد المركزي لمدة 10 دقائق عند 3000 لفة/ دقيقة أنقل 5 مللى لتر الى أنبوب نظيف وأضف .		
المحلول العلوي الرائق	5	—	—
ماء مقطر	—	5	—
المحلول القياسي	—	—	5
حامض فوق الكلوريك	0.4	0.4	0.4
الموليبدات	0.4	0.4	0.4
العامل المختزل	0.2	0.2	0.2
	ترج الانابيب بلطف بعد كل إضافة ثم تترك في الأخير لمدة 10 دقائق ويقرأ اللون الأزرق عند الموجة 700مللي ميكرون .		

طبق طريقة الحساب كما هو موضح في التجربة .

* الحجوم الموضحة في الجدول بالمللي لتر .

الحساب : -

مللي غرام فوسفور غير عضوي كل (100) مللي لتر من البلازما او الدم .

$$\frac{\text{قراءة الاختبار} - \text{قراءة الكفيء}}{\text{قراءة القياس} - \text{قراءة الكفيء}} \times \frac{(0.02) \times (100)}{(0.5)} = \frac{\text{قراءة الاختبار} - \text{قراءة الكفيء}}{\text{قراءة القياسي} - \text{قراءة الكفيء}} \times (4)$$

حيث (0.02) تركيز الفوسفور في المحلول القياسي ، (0.5) تساوي حجم الدم او البلازما الدم المستخدم في التجربة في القياس .

وللتحويل الى وحدات دولية mmol/L تضرب بالمعامل 0.323. .

(ب) - تقدير الفوسفات الذائبة بالحامض :-

انبوب النموذج - ضع (2) مللي لتر من رشيح بلازما او مصل الدم مع حامض الخليك ثلاثي الكلور (انظر الفوسفات غير العضوية اعلاه) ﴿والذي يعادل (0.2) مللي لتر من بلازما الدم﴾ او ، (0.5) مللي لتر من رشيح الدم الكلي مع حامض الخليك ثلاثي الكلور والذي يعادل (0.05) مللي لتر من الدم) في انبوبة اختبار مصنوعة من زجاج ذو مقاومة جيدة للاحماض وعليه علامة تبين حجم جزء من الانبوبة يعادل (5) مللي لتر اضف كمية من حامض الفوق كلوريك تركيز (60%) وقطع صغيرة من الكاربورندة (carborundum) لمنع الغليان الشديد الغير منتظم (bumping) عند التسخين سخن محتويات الانبوب بحرص على مسخن كهربائي او باستخدام حمام (sand bath) يلاحظ انه يتم فقدان حوالي (0.1) مللي لتر من حامض الفوق كلوريك خلال التسخين . وعندما تصبح محتويات الانبوب مركزة تتحول الى اللون البني وبعدها عندما تستمر الحرارة في الارتفاع يبدأ الحامض بالتدخين وتصبح محتويات الانبوبة عديمة اللون وهذا يدل على تأكسد المادة العضوية تماماً والذي يتم خلال دقائق قليلة .

في بعض الحالات وعندما تكون كمية المادة العضوية كبيرة والتأكسد بطيء قد يصبح من الضروري اضافة قطرة من حامض النتريك المركز وكذلك من محلول فوق اوكسيد الهيدروجين (تركيز 30%) مع ضرورة استمرار التسخين لثلاث او اربع دقائق بعد ان يصبح الخليط عديم اللون ، وذلك لطرد الزائد من هذه الكواشف (حامض النتريك او فوق اوكسيد الهيدروجين) ثم خفف المحتويات بعد تبريدها وحتى علامة الـ (5) مللي لترات بالماء المقطر .

ثم تضاف (0.4) مللي لتر من محلول المولبيدات تركيز (5%), (0.2) مللي لتر من محلول العامل المختزل مع المزج جيداً بعد كل اضافة وتترك لمدة عشرة دقائق لاستكمال تولد اللون الازرق الذي يتناسب مع كمية الفوسفور بالانبوب ويقرأ اللون عند الموجة الضوئية (700mμ) او مستخدماً المرشح الاحمر (Ilford red filter 608) .

انبوب المحلول القياسي :-

يتم في نفس الوقت تهيئة انبوب المحلول القياسي باستخدام (5) مللي لتر من المحلول القياسي والذي يكافيء (0.02) مللي غرام من الفوسفور ثم يضاف اليها (0.4) مللي لتر من محلول حامض الفوق كلوريك تركيز (60%) ، (0.4) من محلول المولبيدات تركيز (5%) ، (0.2) من محلول العامل المختزل ثم تخلط الانابيب جيداً وتترك مستقرة لمدة عشرة دقائق لاستكمال توليد اللون الازرق (الذي يتناسب مع كمية الفوسفور بالانبوب) .

ويقرأ اللون عند الموجة الضوئية (700mu) او مستخدماً المرشح الاحمر (Ilford red filter 608) .

انبوب الكفيء : كما سبق وصفه تحت تقدير الفوسفات الغير عضوية .

جدول (8) لتقدير الفوسفات الذائب في الحامض في مصل الدم أو البلازما

المحلول*	النموذج	الكفيء	القياس
حامض ثلاثي كلور الخليك	9	—	—
مصل أو البلازما	1	—	—
	أمزج جيداً واترك لمدة 5 دقائق ثم ضع في جهاز الطرد المركزي لمدة 10 دقائق عند 3000 لفة/دقيقة ثم انقل 2 مللي لتر من المحلول العلوي الرائق الى انبوب نظيف .		
المحلول العلوي الرائق	2		
حامض فوق الكلوريك 60٪	5		
	سخن لعدة دقائق حتى يصبح المحلول في الانبوب عديم اللون ثم يبرد الانبوب وخفف بالماء ليصل الحجم الى 5 مللي لتر وأكمل .		
الحجم المعدل أعلاه	5	—	—
ماء مقطر	—	5	—
محلول قياسي	—	—	5
محلول فوق الكلوريك	0.4	0.4	0.4
الموليبدات	0.4	0.4	0.4
العامل المختزل	0.2	0.2	0.2
	أمزج جيداً واترك الانابيب لمدة 10 دقائق واقرأ اللون الازرق عند 700 مللي مايكرون .		

طبق طريقة الحساب كما هو موضح في التجربة .

* الحجوم الموضحة في الجدول بالمللي لتر .

الحساب :

مجموع الفوسفور الذائب بالحامض .

$$= \frac{\text{قراءة الاختبار} - \text{قراءة الكفيء}}{\text{قراءة القياسي} - \text{قراءة الكفيء}} \times 0.02 \times \frac{100}{\text{ح}} = \text{مللي غرام فوسفات/(100) مللي لتر}$$

حيث (0.02) = تركيز الفوسفور في كمية المحلول القياسي المستخدم ، ح = حجم النموذج المستخدم من الدم الكلي او بلازما الدم .

2 - فوسفات الاستر في مصل الدم :-

ويتم الحصول عليه بطرح قيمة الفوسفات الغير العضوية من مجموع الفوسفات الذائبة بالحامض . اي التي توجد برشح مصل مصل الدم المعالج بحامض الخليك ثلاثي الكلور .

3 - الفوسفات الدهني بالدم او بلازما الدم :-

ويتم ذلك باستخلاصه مستخدماً مزيج من الأيثر والكحول .

الطريقة :-

يتم أضافة (0.5) مللي لتر من البلازما او الدم على شكل قطرات مع الرج الى خليط في (5) مللي لتر كحول نقي و (1) مللي لتر من الايثر في قارورة حجمية سعة (10) مللي لتر . يتم تسخين الخليط بعناية في حمام مائي حار وحتى الغليان وبعد ذلك تبرد ويكمل الحجم الى العلامة بمزيج الكحول والايثر ويتم المزج جيداً . ويرشح الخليط وتؤخذ (4) مللي لترات من الرشيح ﴿يعادل (0.2) مللي لتر بلازما﴾ وتبخر على حمام مائي بعناية الى الجفاف (يفضل أجراء التبخير على مرحلتين كل على (2) مللي لتر من الراشح للتقليل من الرغوة ، والفوران وفقدان المحلول) . يجري التبخير في انبوب اختبار يحمل علامة عند الحجم (6) مللي لتر . يتم تحطيم المادة العضوية وتقدر الفوسفات بعد الهضم بحامض الفوق كلوريك كما في الطريقة المشار اليها لتقدير مجموع الفوسفات الذائبة بالحامض في البلازما .

المحاليل :

1 - **محلول حامض الخليك ثلاثي الكلور** :- تذاب (10) غرامات من نوعية جيدة النقاوة من حامض الخليك ثلاثي الكلور في كمية من الماء ويكمل الحجم الى (100) مللي لتر بالماء المقطر .

2 - **حامض فوق الكلوريك** : - نوعية نقية تركيز - (60%) .

3 - **محلول موليبيدات الامونيوم** : -(5) غرام من موليبيدات تذاب في كمية من الماء ويكمل الحجم الى (100) بالماء المقطر .

4 - **محلول العامل المختزل** : - تذاب (50) مللي غرام من حامض الاسكوربيك في (25) مللي لتر من الماء المقطر . محضر حديثا قبل اجراء كل اختبار .

5 - **محلول الفوسفات القياسي المخزون** : - **(Stock standard phosphate)**

يحضر باذابة (2.194) غرام من فوسفات البوتاسيوم ثنائي الهيدروجين النقية في كمية من الماء المقطر ثم يكمل الحجم الى (500) مللي لتر ﴿يحتوي هذا المحلول على (1) مللي غرام فوسفور في كل واحد مللي لتر﴾ .

6 - **محلول الفوسفات المتداول** : - **(Working standard phosphate)** .

يحضر بتخفيف (2) مللي لتر من محلول الفوسفات القياسي المخزون الى (500) مللي لتر من الماء المقطر يحتوي هذا المحلول على (0.02) مللي غرام فوسفور في كل (5) مللي لتر ﴿اي (0.004) مللي غرام/ المللي لتر﴾ ويتم حفظ كل من المحلولين بعد اضافة (1) مللي لتر كلورفورم مع المزج الجيد . وذلك لمنع اي تلوث لنمو البكتريا والتي قد تسبب فقدان الفوسفات الغير العضوية من المحلول لامتصاصه واستخدامه بواسطة البكتريا النامية .

الفوسفور الغير العضوي بالادرار : -

يكاد يكون جميع الفسفور في البول من النوع الغير عضوي وان الكمية التي يتم طرحها في البول تعتمد بطبيعة الحال بصورة رئيسية على كمية الفوسفور المأخوذة في الطعام ويبلغ معدل ما يطرح من الفوسفور يوميا في الحالات الاعتيادية حوالي (1) غرام .

وهناك ثلاثة انواع من مركبات الفوسفات الغير العضوية وذلك تبعا لعدد ذرات الهيدروجين والتي يتم احلال عنصر اخر محلها في حامض الفوسفوريك .

وتبعا لذلك فان هناك مركبات الفوسفات الاتية للصوديوم والبوتاسيوم والكالسيوم .

مركبات فوسفات الصوديوم : ـ

الفوسفات احادية الصوديوم ثنائية الهيدروجين (NaH_2PO_4)
الفوسفات ثنائية الصوديوم احادية الهيدروجين (Na_2HPO_4)
الفوسفات ثلاثية الصوديوم (Na_3PO_4)

مركبات فوسفات البوتاسيوم :

الفوسفات احادية البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين (KH_2PO_4)
الفوسفات ثنائية البوتاسيوم احادية الهيدروجين (K_2HPO_4)
الفوسفات ثلاثية البوتاسيوم (K_3PO_4)

مركبات فوسفات الكالسيوم :

فوسفات الكالسيوم احادية الهيدروجين ($CaHPO_4$)
فوسفات الكالسيوم ثنائية الهيدروجين ($Ca(H_2PO_4)_2$)
فوسفات الكالسيوم ($Ca_3(PO_4)_2$)

ان املاح الفوسفات ثنائية الهيدروجين لها تفاعل حامضي في حين ان املاح الفوسفات احادية الهيدروجين لها تفاعل قلوي . كما وان املاح الكالسيوم والمغنيسيوم ثنائية الهيدروجين اكثر ذوبانا من تلك احادية الهيدروجين وعليه فان الاملاح الاحادية الهيدروجين تترسب بسهولة واكثر من املاح ثنائية الهيدروجين عندما يكون البول قاعدي وتترسب الاملاح الثنائية الهيدروجين عندما يكون البول حامض . وبذا فان ترسيب املاح الفوسفات بالبول قد لا يكون بسبب زيادة املاح الفوسفات المطروحة بالبول وانما يعود الى الاختلاف في درجة ذوبان هذه الاملاح مع تغير أ س ها البول .

وهناك حالات مرضية تتغير فيها الكمية المطروحة بالبول من مركبات الفوسفات والتي يمكن الاشارة الى بعض منها فيما يلي :ـ

أ – توجد زيادة في طرح الفوسفور في البول في حالة فرط نشاط الغدة الجنب درقية (hyper-parathyroidism) .

ب – تنخفض الكمية المطروحة من الفوسفات بالبول في حالة نقص نشاط الغدة الجنب الدرقية (hypo-parathroidism) وكذلك في حالة الكساح .

تقدير الفوسفات الغير العضوي في البول :ـ

انبوب اختبار نموذج الادرار :

نظرا للارتفاع واتساع مدى تركيز الفوسفور في البول فان الفحص يتم على بول مخفف بنسبة (1 : 100) بالماء المقطر .

الطريقة :ـ

يوضع في انبوبتين (5,2) مللي لتر من البول المخفف بنسبة 1 : 100 ثم يضاف الى الانبوب الاول (3) مللي لتر من الماء المقطر ثم يضاف لكل انبوب (0.4) مللي لتر من حامض فوق الكلوريك ، (0.4) مللي لتر من محلول موليبيدات الامونيوم تركيز (5%) ، (0.2) مللي لتر من محلول العامل المختزل . امزج محتويات الانابيب بهدوء بعد كل اضافة وفي النهاية اخلط جيدا بالقلب والرج . وتترك الانابيب لتستقر لمدة عشرة دقائق ثم يقرأ اللون الازرق الناتج عند الموجة الضوئية (700 mu) او باستخدام مرشح اللون الاحمر (ilford red 608) .

نموذج المحلول القياسي :

توضع (5) مللي لترات من محلول الفوسفات القياسي ﴿يحتوي على (0.02) مللي غرام الفوسفور﴾ في انبوب اختبار اخر وتعالج بنفس المحاليل كما في الاختبار اعلاه .

انبوب الكفىء : كما سبق وصفه تحت تقدير الفوسفور الغير عضوي في الدم .

جدول (9) تقدير الفوسفات الغير العضوي في البول

المحلول*	النموذج	النموذج	الكفىء	القياس
بول مخفف 1 : 100	2	5	—	—
ماء مقطر	3	—	5	—
محلول قياسي	—	—	—	5
حامض فوق الكلوريك	0.4	0.4	0.4	0.4
الموليبدات	0.4	0.4	0.4	0.4
العامل المختزل	0.2	0.2	0.2	0.2
	أمزج الانابيب جيداً واتركها لمدة 10 دقائق ثم أقرأ اللون			
	الأزرق عند 700 مللي مايكرون .			

ثم طبق طريقة الحساب كما هو موضح في التجربة

* الحجوم الموضحة في الجدول بالمللي لتر .

الحساب :

$$\text{مللي غرام فوسفور في (100) مللي لتر من البول} = \frac{\text{قراءة الاختبار} - \text{قراءة الغفل}}{\text{قراءة القياسي} - \text{قراءة الغفل}} \times (0.02) \times \frac{(100)}{(0.02)}$$

$$= \frac{\text{قراءة الاختبار} - \text{قراءة الغفل}}{\text{قراءة القياسي} - \text{قراءة الغفل}} \times (100)$$

حيث (0.02) تركيز الفوسفور في المحلول القياسي .

(0.02) حجم البول الاصلي بالانبوب بالمللي لتر واذا استخدمت (0.05) مللي لتر من البول تستخدم طريقة الحساب كالتالي :-

$$\frac{\text{قراءة الاختبار} - \text{قراءة الغفل}}{\text{قراءة القياسي} - \text{قراءة الغفل}} \times 0.02 \times \frac{100}{0.05}$$

$$\frac{\text{قراءة الاختبار} - \text{قراءة الغفل}}{\text{قراءة القياسي} - \text{قراءة الغفل}} \times (40)$$

حيث (0.05)= حجم البول الاصلي في الانبوب بالمللي لتر .

هيموجلوبين الدم

ان تقدير كية الهيموجلوبين في الدم ليس بالامر السهل ويرجع السبب في ذلك الى عدم امكانية الحصول على محاليل قياسية من الهيموجلوبين يعتمد عليها وان كان العديد من المختبرات تستخدم حاليا مادتي (cyanmethaemogloobin) او (oxyhaemoglobin) كمواد قياسية والاخير اكثر استعمالا لسهولة الحصول عليه بتخفيف كمية من الدم بمحلول قلوي ضعيف وان كان المحلول الناتج يبدأ في التغير والتدهور (deteriorate) بعد بضع دقائق فقط . ومن جهة اخرى فان استخدام مادة السيانوهيموجلوبين لها عدة مميزات : (1) ان محاليله ثابتة (2) من السهل تحويل جميع هيموجلوبين الدم الي السيناهيموجلوبين ومن ثم الغاء اي خطأ من وجود صبغات اخرى بالدم . اما العيب الوحيد لهذه الطريقة هو استخدام مادة السيانيد السامة لتحضير السيناهيموجلوبين المخفف وان كانت كميتها صغيرة جدا .

1) طريقة السيانوهيموجلوبين :

أ - يخفف الدم في هذه الطريقة بنسبة (1 : 201) وذلك باضافة (0.05) مللي لتر من الدم الى (10) مللي لتر من المحلول المخفف (diluent) او ، ﴿باضافة (0.02) مللي لتر من الدم الى (4) مللي لتر من المحلول المخفف﴾ ولزيادة الدقة يمكن اضافة (0.5) مللي لتر من الدم تقاس باستخدام ماصة (Ostwald) الى (100) مللي لتر من المحلول المخفف ويترك المحلول لمدة لا تقل عن 10 دقائق عند حرارة الغرفة حتى يتولد اللون وهو دائم الثبات (stable almost indefinitly) .

ب - المحلول القياسي : يحضر بتركيز (49.8) مللي غرام من السيانوهيموجلوبين في (100) مللي لتر وتقارن الالوان عند الموجة الضوئية طول (540) مللي ميكرون او باستخدام مرشح ضوئي ذو اللون الاصفر ـ المخضر (yellow green light filter) وتطبق المعادلة :-

$$\frac{\text{الاختبار} - \text{الكفيء}}{\text{القياسي} - \text{الكفيء}} \times \frac{(49.8)}{(1000)} \times (201)$$

$$= \frac{\text{الاختبار} - \text{الكفيء}}{\text{القياسي} - \text{الكفيء}} \times (10) = \text{غرام هيموجلوبين/(100) مللي لتر من الدم}$$

ملحوظة : في كثير من الاحيان قد يصعب الحصول على نموذج تجاري لمادة السيانوهيموجلوبين وهذا يستلزم تحضير المادة بالمختبر التي يمكن الحصول عليها تبعا للخطوات التالية :-

أ - نفسل كمية من كريات الدم الحمراء بعدة حجوم من محلول الملح الفسيولوجي ولعدة مرات مع الفصل بجهاز الطرد المركزي في كل مرة .

ب - امزج حجم من الكريات التي تم غسلها مع حجم من الماء .

ونصف الحجم من التولوين ورج جيداً لبضع دقائق ثم شغل في جهاز الطرد المركزي وافصل محلول الهيموجلوبين بعناية . انقل (2.5) مللي لتر من محلول الهيموجلوبين الى وعاء قياسي سعة (500) مللي لتر ويحتوي على (150) مللي لتر من المحلول المخفف . وبعد (15) دقيقة اضف (50) مللي لتر من محلول البوراكس تركيز (0.1M) ثم اكمل بالمحلول المخفف الى العلامة . قس الكثافة الضوئية عند الموجة (540) مللي ميكرون واستنتج التركيز بتطبيق المعادلة

$$\frac{x}{49.8} \times 0.340 = R$$

حيث ان المحلول القياس تركيز (49.8) مللي غرام من مادة السيانوهيموجلوبين في (100) مللي لتر يعطي كثافة ضوئية ﴿عند الموجة (540) مللي ميكرون﴾ مقدارها (0.340) .
وحيث (x) = تركيز المحلول القياسي المحضر (R) الكثافة الضوئية لهذا المحلول القياسي المحضر .

المحاليل :

المحلول المخفف : اذب (200) مللي غرام من بوتاسيوم سيانيد الحديديك ، (50) مللي غرام من سيانيد الصوديوم 140 ملغم من فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين (KH_2PO_4) في كمية من الماء واكمل حتى اللتر . ثم اضف (0.5) ملي لتر من مادة (Sterox SE) واحفظ المحلول في زجاجة بنية وأهمل المحلول اذا ظهرت به اية عكارة (turbidity) .

محلول (0.1) بوراكس : اذب (38) غرام من رابع بورات الصوديوم (tetraborate, sodium $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$) واكمل اللتر بالماء فقط .

2) طريقة تقدير الحديد :

يحتوي مصل الدم على اثار قليلة جدا من الحديد يمكن اهمال تأثيرها عند تقدير الهيموجلوبين عن طريق تقدير محتوى الحديد بنموذج من الدم . فالهيموجلوبين يحتوي على (0.347%) من الحديد ويمكن تقدير الحديدفي نموذج الدم باحدى الطرق الاتية :-

أ - يتم وضع (2) مللي لتر من الدم في دورق مخروطي سعة (250) مللي لتر . يضاف (10) مللي لتر من حامض النيتريك المركز ويبدأ التسخين بلطف على سخان كهربائي لمدة ساعة (بعد انتهاء هذه الفترة تصبح محتويات الوعاء سائل اصفر بدون وجود رواسب) . تضاف (5) مللي لتر من حامض فوق الكلوريك (perchloric) ويستمر التسخين ولمدة (3-4) ساعات تصبح بعدها المحتويات صلبة اي حتى الجفاف . برد ثم اضف (10) مللي لتر اخرى من حامض فوق الكلوريك وسخن حتى يذوب الراسب تماما . برد ثم خفف باضافة (20) مللي لتر من الماء وانقل محتوى الدورق الى وعاء قياسي سعة (100) مللي لتر مع غسل الدورق بالماء المقطر عدة مرات لاتمام نقل محتوى الدورق كميا واضبط للعلامة مع المزج الجيد .

حضر انبوب قياسي بنقل (2) مللي لتر من محلول قياسي (يحتوى على (50) مللي غرام / (100) مللي لتر) الى وعاء حجمي سعة (100) مللي لتر واضف (10) مللي لتر من حامض فوق الكلوريك واكمل حتى العلامة .
حضر محلول كفوء بوضع (10) مللي لتر من حامض فوق الكلوريك في وعاء حجمي سعة (100) مللي لتر واكمل بالماء .

اترك المحاليل لعدة ساعات لتصل درجة حرارتها الى درجة حرارة الغرفة ثم قارن

الكثافة الضوئية عند (260)مللي ميكرون ﴿يمتص محلول فوق كلورات الحديديك (ferric perchlorate)﴾ في منطقة الاشعة فوق البنفسجية كما يتم تحطيم والتخلص من جميع المواد التي يمكن ان تتداخل في الطريقة وتؤثر على النتيجة بعملية الهضم (digestion) مع حامض فوق الكلوريك﴾ ،

ثم طبق المعادلة

$$\frac{\text{الاختبار} - \text{الكفيء}}{\text{القياسي} - \text{الكفيء}} \times (50) = \text{مللي غرام حديد/(100)مللي لتر من الدم}$$

$$\frac{\text{الاختبار} - \text{الكفيء}}{\text{القياسي} - \text{الكفيء}} \times \frac{(50)}{(1000)} \times \frac{(100)}{(0.347)}$$

$$= \frac{\text{الاختبار} - \text{الكفيء}}{\text{القياسي} - \text{الكفيء}} \times (14.4) = \text{غرام هيموجلوبين/(100)مللي لتر من الدم}$$

جدول (10) تقدير الهيموجلوبين عن طريق تقدير الحديد الكلي في الدم

المحلول*	النموذج	الكفيء	القياس
الدم	2		
حامض نتريك مركز	10		
	سخن على سخان كهربائي لمدة ساعة حتى يأخذ المحلول لون أصفر مع عدم وجود راسب ثم أضف للأنبوب .		
حامض فوق الكلوريك	5	—	—
	سخن لمدة 3–4 ساعات ثم برد وأضف		
حامض فوق الكلوريك	10		
	سخن حتى يختفي اي راسب ثم برد وأنقل بالكامل الى دورق حجمي سعة 100 مللي لتر وأكمل الحجم بالماء المقطر حتى العلامة .		
محلول قياسي	—	—	2
حامض فوق الكلوريك	—	10	10
ماء مقطر	—	90	88
	اترك المحاليل لتبرد لدرجة حرارة الغرفة ولمدة 3 ساعات ثم أقرأ الامتصاص عند 260 مللي ميكرون .		

طبق طريقة الحساب كما هو موضح في التجربة .

* الحجوم الموضحة في الجدول بالمللي لتر .

المحاليل :

1 - حامض فوق الكلوريك النقي المركز (60%) .

2 - محلول الحديد القياسي : زن (50) مللي جرام من سلك الحديد النقي (بعد تنظيفها جيدا بقطعة من السنفرة (sand paper or emery paper) ثم ذوب في كمية صغيرة من حامض فوق الكلوريك ثم برد وخفف بنفس الحجم من الماء . سخن حتى يتم طرد الماء وتنتج ابخرة بيضاء كثيفة (copious white fumes)) . ثم برد وخفف الى (100) مللي لترات بالماء المقطر .

ب - طريقة (Wong)

ينقل (0.5) سم من الدم الى دورق حجمي سعته (50) سم ثم يضاف اليه (2) سم من محلول حامض الكبريتيك المركز الخالي من الحديد ويمزج جيدا لمدة (1-2) دقيقة ، ثم يضاف اليه 2 مللي لتر من محلول فوق كبريتات البوتاسيوم المشبع (saturated potassium persulphate) ويمزج ثم يخفف المزيج الى (25) سم بالماء المقطر ويضاف له (2) سم من محلول (10%) تنغستات الصوديوم (sodium tungstste) ويمزج جيدا يبرد المزيج بعد ذلك الى درجة حرارة الغرفة ويكمل الحجم باستعمال الماء المقطر ويمزج جيدا . يرشح المزيج في اناء نظيف وينقل (20) مللي لتر من الراشح الى اسطوانة مدرجة . في اسطوانة اخرى يوضع (1) سم من محلول قياسي يحتوي على (0.1 ملغم حديد / سم) ثم يضاف (0.8) سم من محلول حامض الكبريتيك المركز الخالي من الحديد ويخفف المزيج الى (20) سم بالماء المقطر ويبرد الى درجة حرارة الغرفة يضاف الى كل من الاسطوانتين (المحلول تحت الاختبار والمحلول القياسي) 1 سم من محلول فوق كبريتات البوتاسيوم المشبع ، (4) سم من محلول ثيوسيانات البوتاسيوم تركيز (3) عياري (3N potassium thiocyanate) ويمزج جيدا وتقرأ تراكيز الالوان باستخدام المطياف (spectrophotometer) بطول موجي (520 mu) مللي مايكرون . ثم تحسب كمية الحديد طبقا للقانون التالي :-

ص ملغم حديد / (100) سم من الدم .

$$= \frac{\text{قراءة المحلول تحت الاختبار}}{\text{قراءة المحلول القياسي}} \times \text{تركيز المحلول القياسي}$$

$$\times \frac{(50)}{(20)} \times \frac{(100)}{(0.5)}$$

$$\text{وتكون نسبة الهيموجلوبين} = \frac{\text{ص}}{(3.35)} \text{ غم هيموجلوبين(100)سم دم}$$

جدول (11) تقدير الهيموجلوبين بطريقة wong

المحلول*	النموذج	الكفىء	القياس
الدم	0.5		
حامض الكبريتيك المركز	2.0		
	امزج جيداً		
فوق كبريتات البوتاسيوم المشبع	2		
	أمزج الخليط جيداً		
ماء مقطر	25		
	أمزج الخليط جيداً		
تنجستات الصوديوم	2		
	يمزج الخليط جيداً ويبرد الى حرارة الغرفة ثم يكمل الحجم الى 50 بالماء المقطر ثم يرشح .		
الراشح من الخطوات السابقة	20	—	—
محلول قياسي	—	—	1
حامض كبريتيك مركز	—	0.8	0.8
ماء مقطر	0.8	20	20
فوق كبريتات البوتاسيوم المشبع	1	1	1
محلول ثيوسيانات البوتاسيوم	4	4	4
	أخلط جيداً واقرأ اللون عند 520 مللي ميكرون .		

طبق طريقة الحساب كما هو موضح في التجربة .

* الحجوم الموضحة في الجدول بالمللي لتر .

المحاليل

- حامض الكبريتيك المركز النقي الخالي من الحديد (analar) .
- محلول تنغستات الصوديوم (sodium tungstate) .

يذاب (10) غرام من هذه المادة في (90) سم من الماء المقطر الخالي من الحديد .
ويكمل الحجم الى العلامة في دورق حجمي سعته (100) سم .
- محلول (saturated potassium persulphate) .
يذاب (7) غم من هذه المادة النقية في (100) سم من الماء المقطر ويرج جيدا .
- محلول ثيوسيانات البوتاسيوم تركيز (3) عياري (3 n potassium thiocyanate) يذاب (146) غم من هذه المادة النقية في الماء المقطر ويكمل الحجم الى (500) سم في دورق حجمي .

- محلول الحديد القياسي (0.1) ملغم حديد / سم) يذاب (0.7) غم من بلورات كبريتات الامونيوم الحديدوزية $(NH_4)_2SO_4.FeSO_4.6H_2O$ في (50) سم من الماء المقطر ثم يضاف للمحلول (20) سم من محلول حامض الكبريتيك بتركيز (10%) ويسخن المزيج قليلا ثم يضاف اليه بضع قطرات من محلول (0.1) عياري برمنغنات البوتاسيوم لاكسدة الحديدوز الى حديديك ويخفف المحلول بالماء المقطر الى (1) لتر .

حديد المصل (Serum iron)

الحديد هو احد المكونات الهامة في جسم الانسان وتبلغ كيته في جسم الانسان البالغ حوالي (4) غرام واغلبه يدخل في تركيب الدم والحديد الحر في مصل الدم يوجد مرتبط ومحمل على بروتين من مكونات البيتا ـ بروتين ويسمى الترانسفرين . ومن اهم وظائف مركبات الحديد في الجسم تتعلق بنقل الاوكسجين والتنفس الخلوي (cell respiration) .

ويتناول الانسان اعتياديا الحديد مع الطعام ويكون على صورة هيدروكسيد الحديديك الغروي والذي يتم اختزاله في الوسط الحامض بالمعدة الى الحديدوز . والاخير يتم امتصاص غالبيته وعلى حسب حاجة الجسم من قبل الخلايا المبطنة للاثنى عشري والجزء الاول (لا يزيد على 6 بوصات) من الامعاء الدقيقة او حتى في القولون ، ولكن يمكن اهمال هذه الكميات بالقياس الى ما يمتص من الحديد بالاثني عشري .

وبعد الامتصاص تتم اكسدة ايونات الحديدوز الى الحديديك في الغشاء المخاطي للامعاء ويتحد مع احد البروتينات ليكون مركب بروتيني ـ حديدي (iron – protein – complex) يعرف بالحديدين (ferritin) وهذا يخزن في الخلايا المخاطية بالامعاء قبل نقله الى مجرى الدم . يتم اختزال ايون الحديديك الى الحديدوز بعد فصله من الحديدين وقبل ان يدخل تيار الدم حيث يكون معقد مع بروتين من البيتا ـ جلوبيولين مع ثاني اوكسيد الكربون ويعرف بالترانسفرين والاخير يحمل الحديد الى بقية اجزاء الجسم وخاصة نخاع العظم حيث يدخل في تكوين الهيموجلوبين الذي يدخل في تكوين كريات الدم الحمراء .

ويؤدي الاضطراب في تمثيل الحديد (iron metabolism) الى امراض فقر الدم . ويمكن تقسيم فقر الدم الناتج عن نقص الحديد الى قسمين رئيسين وهما :ـ

أ – فقر الدم الناتج عن عوز الحديد الاولى (primary iron deficiency) والذي ينتج عن نقص الحديد في الطعام .

ب – فقر الدم الناتج عن عوز الحديد الثانوي (secondary iron deficiency) والذي ينشأ عن نقص البروتين وخصوصا الترانسفرين . والاخير قد ينشأ نتيجة لسوء التغذية ونقص البروتين الغذائي مؤديا الى انخفاض في تركيز الترانسفرين في الدم ، قد ينشأ نتيجة فقدان البروتينات في البول كما هو الحال في امراض والتهابات الكلية .

كما ينخفض الحديد في مصل الدم في حالة الخباثة في حين يحدث ارتفاع عالي في الحديد في مصل الدم في الصبغة الدموية (haemochromatosis) وفي بعض

امراض الكبد . والصبغة الدموية هو مرض ينتج عن الترسيب المنتشر والملحوظ في الانسجة وذلك على صورة هيموجيديرين (haemosederin) وهيموميوسين (haemomyosin) وهذا يؤدي غالبا الى تضخم الكبد وتلون الجلد ويتم تشخيص هذه الحالات باخذ فحص حزعة (biopsy) من الكبد والجلد وكذلك بالكشف على وجود الهيموسيديرن في نخاع العظم في مثل هذه الحالات .

وحيث ان مستوى الحديد في مصل الدم منخفض فان اهم مصدر للخطأ يأتي من تلوث الادوات والاجهزة الزجاجية التي تستخدم في التجربة . ولذا فينصح بانتقاء واستخدام مجموعة من الحقن والزجاجيات لهذا الغرض . وان الادوات الزجاجية يجب غليها لمدة (1-2) ساعة في محلول حامض الهيدروكلوريك تركيز (20%) ثم غسلها جيدا بالماء المقطر وتجفيفها وعزلها بعيدا عن الغبار والتيارات الهوائية . كما يجب ترك الماصات لمدة لا تقل عن (12) ساعة في محلول حامض الهيدروكلوريك تركيز (5) عياري . كما ان اي محلول يعطي لون مرتفع مع انبوب الكفىء يجب اهماله وتحضير جديد بدلا منه . وان استعمال الحقن البلاستيكية التي تستخدم لمرة واحدة يضيف الدقة الى التقدير . وتعتمد الطريقة اساسا على اختزال الحديد الى الحديدوز باستخدام مادة مختزلة مثل فيتامين ج = c (vitamin ascorbic) او بيكيبريتيت الصوديوم (sodium bisulphite) ثم تكوين المركب الملون مع ($\alpha\alpha$- dipyridyl) او مع (tripyridyl) ومقارنة اللون الناتج مع نظيره من محلول حديد قياسي معلوم التركيز او من منحنى قياس يتم بناءه تبعاً لما هوموضح في طريقة العمل .

ويبلغ المعدل الطبيعي للحديد في مصل الدم (100-150) ميكروغرام وان كانت بعض المراجع تعتبر المعدل من (65-180) ميكروغرام / (100) مللي لتر .

طريقة العمل

يمزج في انبوبة جهاز طرد مركزي 1 سم من كل من مصل الدم ، محلول كبريتيت الصوديوم ، ومحلول ($\alpha\alpha$- dipyridyl) يسخن المزيج في حمام مائي لمدة (5) دقائق ، ثم يبرد ويضاف 1 سم من الكلوروفورم وتسد فوهة الانبوبة بسداد محكم وترج بعنف وباستمرار لمدة (30) ثانية ، ثم يرفع السداد وتوضع الانبوبة في جهاز الطرد المركزي بسرعة (3000) دورة / دقيقة ولمدة (5) دقائق . عند عدم الحصول على سائل طاف رائق يعاد الرج والفصل مرة اخرى ثم تقاس شدة اللون للمحلول الطافي بواسطة المطياف (spectrophometer) بطول موجي (520) مللي مايكرون .

يرسم منحني قياسي وبواسطته يمكن ايجاد تركيز الحديد في النماذج تحت الاختبار وذلك كما يلي :-

رقم الانبوبة (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11) سم محلول حديد القياس (10 ميكروغرام/سم) 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1 .

سم ماء مقطر 1, 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1, 0 ثم تعامل هذه الانابيب تماماً كمعاملة (1)سم من مصل الدم والمفصلة اعلاه .

وللتحويل الى وحدات دولية (ميكرومول/لتر تضرب بالمعامل 0.179 .

المحاليل

- محلول كبريتيت الصوديوم (0.1) جزيئي غرامي .
  يحضر بكميات قليلة لصلاحيته لفترات قصيرة ، ويفضل ان تكون القنينة التي يحضر بها مملوءة تقريبا للحد من الاكسدة بالاوكسجين الجوي .
- محلول (α,α - dipyridyl) بتركيز (0.1%) في حامض الخليك الثلجي 3% (بالحجم) ويحفظ في قنينة داكنة اللون .
- كلوروفورم (analar) .
- محلول قياسي محضر من كبريتات الامونيوم الحديدوزية (10) مايكروغرام/ سم وذلك بأذابة هذه المادة في حامض الهيدروكلوريك او الكبريتيك بتركيز (0.005) عياري لمنع تحللها مائيا .

سعة المصل الكلية والغير مشبعة لربط الحديد

(Total and unsaturated iron binding capacity)

يتم تحميل ونقل الحديد في مصل الدم بواسطة البروتين ترانسفرين . ويحتوي المصل على كمية من هذا البروتين لها قدرة على ربط (250–400) ميكروغرام من الحديد في كل (100) مللي لتر . وهناك قيمة تشخيصية لتقدير هذه السعة حيث وجد انها ترتفع في حالات عوز الحديد الاولى وكذلك في حالات فقر الدم المصاحبة للحمل عند الانسان . كما انها تنخفض في حالة (megaloplastic anaemia) وكذلك في حالات التهاب الكلية المصحوبة بفقدان البروتين بالبول .

ومن جهة اخرى فقد تبلغ تشبع هذا البروتين الى درجة التشبع الكامل تقريبا في حالات الصبغية الدموية وفي حالات فقر الدم التحللي (haemolytic anaemia) في حين ان درجة عدم التشبع (unsaturated iron binding capacity) ترتفع في حالات عوز الحديد الاولى في حين انها قد تكون مرتفعة في عوز الحديد الثانوي . واساس طريقة تقدير سعة الربط بالحديد باضافة كميات زائدة من الحديد الى نموذج من مصل الدم للعمل على تشبع جميع الترانسفرين بالكامل ثم يزال الزائد من الحديد بامتزازه على كربونات المغنسيوم وتقدير الحديد المتبقي والذي يكافىء سعة التشبع الكلية والتي منها يمكن الحصول على قيمة سعة عدم التشبع بطرح قيمة الحديد في مصل الدم من قيمة سعة التشبع الكلية وتتبع نفس الطريقة المشار اليها تحت حديد المصل لتقدير الحديد في مختلف النماذج .

تقدير سعة المصل الكلية لربط الحديد (total iron binding capacity) :

واتبعت طريقة (Ramsay), (1957).

يوضع (1) سم من مصل الدم في انبوبة جهاز الطرد المركزي ويضاف اليه (2) سم من محلول كلوريد الحديديك ويمزج جيدا ويترك لمدة (5) دقائق ، ثم يضاف (200) ملغم من كاربونات المغنيسيوم الخفيفة .

(Light magnesium carbonate) ﴿(100) ملغم لكل سم من كلوريد الحديديك﴾ ، ويرج المزيج جيدا وباستمرار في جهاز رجاج لمدة (30–60) دقيقة لا اطول . توضع الانابيب بعد ذلك في جهاز الطرد المركزي ﴿بسرعة (3000) دورة/دقيقة﴾ لمدة (5) دقائق . ينقل (2) سم من المحلول الطافي الى انبوبة جهاز طرد مركزي نظيفة وجاف ويضاف اليه (0.5) سم من كل من كبريتيت الصوديوم ومحلول (a,a – dipyridyl) وتستمر العملية كما في طريقة تقدير الحديد في مصل الدم . كذلك يستخدم المنحنى القياسي للحديد مع الاخذ بنظر الاعتبار ان (2/3) حجم المصل الاصلي فقط قد استخدم في التجربة .

المحاليل

- محلول كلوريد الحديديك القياسي (5 مايكروغرام/سم في (0.005) ع حامض الهيدروكلوريك) .
- كاربونات المغنيسيوم الخفيفة والخالية من الحديد ، وتستخدم لامتزاز الحديد الزائد .
- محلول (0.2) جزيئي غرامي من كبريتيت الصوديوم .
- محلول (α,α– dipyridy) (0.20% مذاب في حامض الخليك 6%) (بالحجم) .
- كلوروفورم (analar) .

الفصل الرابع

المركبات النيتروجينية غير البروتينية (اليوريا - تصفية اليوريا) (الكرياتين - الكرياتنين - تصفية الكرياتنين) - حامض اليوريك .

يوريا الدم Blood urea

تمثل اليوريا المنتج النهائي لايض البروتينات والاحماض الامينية وهي تنشأ عن انتزاع المجموعات الامينية من الحوامض الامينية وتتم هذه العملية في الكبد . وتشكل اليوريا حوالي 50% من النتروجين الغير البروتين في الدم ويتراوح معدل اليوريا في الدم اعتياديا بين 15–40 مللي غرام من اليوريا في كل 100 مللي لتر ، ولكن عند الاشخاص متقدمي العمر (يزيد عمرهم عن 50 عاما) يمكن اعتبار الحد الاعلى في حدود 50 مللي غرام لكل 100 مللي لتر . وعند التعبير عن تركيز اليوريا بالنسبة لمحتواها من النيتروجين (blood urea nitrogen) فيمكن تحويل تركيز النيتروجين الى يوريا بالضرب في (2.14) ـ ويتغير معدل اليوريا في الدم عند النساء اثناء الحمل وخاصة في الاشهر الاخيرة وتتراوح كميتها ما بين 15–20 مللي غرام لكل 100 مللي لتر . ومن جهة اخرى فان معدل اليوريا في الدم يرتفع في عدد من الحالات المرضية ومنها الانكاز (dehydration) وفي حالات قصور وظائف الكلية الحاد (acute renal failure) وقد تصل القيم في بعض هذه الحالات الى 500 مللي غرام لكل 100 مللي لتر . كما انها ترتفع في حالات الانسداد البروستاتي (prostatic obstruction) ، والانسداد المعوي (intestinal obstruction) اما نقص كمية اليوريا في الدم فانها نادرة وخاصة في حالات امراض الكبد الحادة (acute heptic disorders) كذلك في حالات نقص البروتين الغذائي (protein deficiency) .

طريقة التقدير

تعتمد اغلب الطرق على تحول اليوريا الى كاربونات الامونيوم تحت تأثير انزيم يورياز (urease) والذي يوجد بوفرة في فول صويا (soya–beans) .

$$\underset{\text{urea}}{NH_2-\overset{}{C}(=O)-NH_2} + 2H_2O \xrightarrow[37^\circ C]{\text{enzyme urease}} \underset{\text{ammonium carbonate}}{(NH_4)_2CO_3}$$

وفيما يلي عدة طرق لتقدير الامونيا ومنها :–

أ – طريقة نسلر (Nessler) وتعتمد على تكوين مركب ملون بتفاعل النوشادر مع محلول نسلر .

ب – بتهوية (airation) الامونيا الناتجة في حامض قياسي وتصحيح الحامض الزائد ومن ثم استنتاج كمية الحامض التي تفاعلت مع الامونيا ومنها يمكن حساب كمية النوشادر وبالاضافة الى هذه الطرق فقد تم ابتكار طريقة مباشرة تعتمد على قياس تركيز اللون الناتج من تفاعل اليوريا مع ثنائي الاستيل (diacetyl) . او احد مشتقاته من نوع احادي الاوكيم (monoximes) .

طريقة نسلر

يتم ترسيب البروتينات التي توجد في النموذج اولا ثم يحضر الرشيح الخالي من البروتينات ويعامل جزء منه مع كمية من انزيم يورياز ويمكن اجراء التفاعل مع الانزيم اولا ثم ترسب البروتينات بعد انتهاء التفاعل . بعد ذلك يتم تفاعل الامونيا الناتجة مع كاشف نسلر ويقارن اللون مع نظيره الذي يظهر من تفاعل محلول قياسي من كلوريد الامونيوم مع كاشف نسلر .

وفي نفس الوقت يتم معالجة محلول القياسي من اليوريا طبقاً للخطوات التي ذكرت في الطريقة اعلاه وذلك لاستخدامه كسيطرة للتأكد من نشاط الانزيم وكفاءة المحاليل المستخدمة .

وهنا تجدر الاشارة الى الصعوبة الرئيسية التي قد تنشأ عند اتباع هذه الطريقة وهي العكارة التي قد تنشأ عندما يتم خلط الرشيح مع كاشف نسلر . ويرجع السبب في ذلك الى تكوين مشتقات غير ذائبة من الزئبق مع بعض محتويات كريات الدم الحمراء . ولهذا فمن الضروري جدا تجنب استخدام عينة من المصل او الدم الكامل الذي قد يوجد بها اية اثار لتحلل كريات الدم الحمراء (Lacking of red blood cells cells) .

ان مرسب البروتينات المفضل عند تقدير اليوريا في الدم هو هيدروكسيد الزنك لانه يزيل كمية غير قليلة من المواد التي تسبب عكارة مع محلول نسلر والتي تعتبر من اصعب العقبات في تقدير اليوريا بهذه الطريقة . كما يجب ان يتم تماما تجنب وجود، او استخدام الامونيا في الهواء او الماء المستخدم في تحضير المحاليل . كما وان استخدام الاسيتون كمادة لتنظيف وتجفيف الاواني الزجاجية غالبا ما يسبب عكارة تؤدي الى فشل النتائج ومن ثم فيجب تجنب استخدام الاسيتون لهذا الغرض .

الطريقة : ـ في عدد من انابيب الطرد المركزي أجري مايلي :-

أ – انابيب النموذج تحت الفحص : (مزدوج) (duplicate)

اضف (3.2) مللي لتر من محلول كبريتات الصوديوم سوى القوى او التوتر (isotonic) ثم (0.2) مللي لتر دم وكمية قليلة من أنزيم اليورياز .

ب - انابيب اليوريا القياسية : (مزدوج)

تماما مثل الدم ولكن يضاف (0.2) مللي لتر محلول اليوريا بدلا من نموذج الدم .

جـ - انابيب كفوء الفحص :

اضف (3.4) مللي لتر من محلول كبريتات الصوديوم سوية القوة او التوتر وكمية قليلة من انزيم اليورياز .
اغلق انابيب الطرد المركزي الخمسة واخلط المحتويات جيدا وحضنه عند درجة (37c ولمدة (20) دقيقة ثم اضف (0.3) مللي لتر من محلول كبريتات الزنك وخض جيدا واتبع ذلك باضافة (0.3) مللي لتر من محلول هيدروكسيد الصوديوم وخض جيدا مرة اخرى واترك الانبوب لمدة (10) دقائق لترسب البروتينات .

ضع الانابيب في جهاز الطرد المركزي وشغل لمدة 10 دقائق عند (3000) لفة في الدقيقة . ثم اسحب (2) مللي لتر من محلول العلوي الرائق في انبوب جاف ونظيف .

د - كلوريد الامونيوم القياسي : (مزدوج)

ضع (2) مللي لتر من محلول الامونيوم القياسي في انبوبة اختبار .

هـ - الكفوء القياسي : ضع (2) مللي لتر من الماء المقطر الخالي من النشادر في انبوبة اختبار .
اضف لكل من الانابيب التي تم تحضيرها اعلاه وعددها (8) (5) مللي لتر من الماء المقطر الخالي من الامونيا ثم نقطة واحدة من محلول اليود . وعندما تكون جاهزا لقياس الكثافات الضوئية . خذ كل انبوب على حدة بالتتابع واضف اليه (1) مللي لتر من كاشف نسلر . اخلط المحتويات جيدا واقرأ اللون فورا .

$$\text{الحساب} = \frac{\text{قراءة النموذج}}{\text{قراءة القياسي}} \times 0.1 \times \frac{100}{0.1} = \text{مللي جرام/100سم}^3$$

جدول (12) تقدير اليوريا بطريقة استخدام كاشف نسلر

المحلول*	النموذج	كفيء النموذج	اليوريا القياس	كلوريد الامونيوم القياس	الكفيء القياس
كبريتات الصوديوم	3.2	3.2	3.2	–	–
الدم	0.2	–	–	–	–
انزيم اليوريز	كمية قليلة	كمية قليلة	كمية قليلة	–	–
الامونيوم القياس	–	–	–	2	–
محلول اليوريا	–	–	2	–	–
	حضن أنابيب النموذج وكفيء النموذج واليوريا القياس عند درجة 37 م ولمدة 20 دقيقة ثم أضف .				
كبريتات الزنك	0.3	0.3	0.3	–	–
	أمزج جيداً .				
هيدروكسيد الصوديوم	0.3	0.3	0.3	–	–
	أمزج جيداً وأترك لمدة 10 دقائق لترسيب البروتينات ثم ضع في جهاز الطرد المركزي لمدة 10 دقائق عند 3000 لفة/دقيقة ثم أنقل 2 مللي لتر من المحلول العلوي الرائق لأنبوب نظيف				
المحلول العلوي الرائق	2	2	2	–	–
ماء مقطر	5	5	5	5	7
محلول اليود	نقطة واحدة	نقطة واحدة	نقطة واحدة	نقطة واحدة	نقطة واحدة
	جهز جهاز قياس الكثافة الضوئية وعندئذ أضف على التتابع مباشرة قبل القراءة في الجهاز الى كل أنبوب مع الخلط الجيد وعند الموجة 450 مللي ميكرون .				
كاشف نسلر	1	1	1	1	1

طبق طريقة الحساب الموضحة في التجربة .

* الحجوم الموضحة في الجدول بالمللي لتر .

ملحوظة :- عندما يكون الجو حاراً (درجة الحرارة تزيد عن (25c°م)) ضع الانابيب في حمام مائي بارد يتراوح حرارته من (10c-15°م) قبل اضافة كاشف نسلر .

وذلك لعدم فقدان اية كمية من النوشادر الناتجة عن تحلل اليوريا بالانزيم يورياز تقرأ الكثافات الضوئية عند الموجة الضوئية (450 mu) واذا كانت قيمة الكثافة الضوئية للنموذج مرتفعة وتزيد على (0.8) اعد الفحص مستعملا (0.1) مللي لتر من الدم او مستخدما (1) مللي لتر من المحلول الرائق بعد ترسيب البروتينات .

الكواشف :

كاشف نسلر :

يتم وزن (11.3) غرام من بلورات اليود بالميزان الاعتيادي وتذاب في محلول سبق تحضيره باذابة (15) غرام من ايوديد البوتاسيوم (potassium iodide) في (10) مللي لتر ماء . يضاف معظم محلول اليود الى (15) غرام زئبق موضوعة في قنينة ذات غطاء زجاجي (glass stoppered reagent bottle) ويحفظ الخليط عند درجة حرارة منخفضة بوضعه في حوض به ماء بارد ويرج جيدا من وقت الى اخر الى حين اختفاء لون محلول اليود تقريبا وبعد ذلك يتم ترشيح السائل الرائق العلوي في قارورة سعة (100) مللي لتر ويتم فحص نقطة واحدة من المحلول باضافتها الى انبوب به (1-2) سم3 من محلول (1%) من النشا فينتج لون ازرق باهت مما يدل على وجود اثار طفيفة فقط من اليود . عندئذ يخفف المحلول الى علامة ال (100) مللي لتر ويضاف الى (485) مللي لتر من محلول هيدروكسيد الصوديوم تركيز (10%) واذا ظهرت اية عكارة بالمحلول فيجب ترشيحه او تركه لتستقر المواد العالقة به قبل الاستعمال ويحفظ في القنينة ذات سدادة من المطاط .

محلول اليود :

تذاب (2) غرام من اليود في محلول يتم تحضيره باذابة (3) غرام من ايوديد البوتاسيوم في (15) مللي لتر ماء ويكمل الحجم الى (100) مللي لتر .

محلول كلوريد الامونيوم القياسي : (يكافىء (0.015) مللي غرام من اليوريا (1) سم3) توزن (267.5) مللي غرام من كلوريد الامونيوم النقية المجففة في مجفف (desicator) .

وتذاب في كمية من الماء ويكمل الحجم الى اللتر الواحد . يضاف الى (100) مللي لتر من هذا المحلول 10 مللي لتر من حامض الكبريتيك العياري ثم يكمل الحجم الى لتر بالماء المقطر .

محلول اليوريا القياسي :

تـذاب (100) مللي غرام في (100) مللي لتر من المـاء المقطر مـع اضـافـة نقطـة من الكلوروفورم كمادة حافظة ويحفظ المحلول في مكان بارد .

محلول كبريتـات الصوديوم سوى القوة او التوتر : يتم اذابـة (30) غرام من كبريتـات الصوديـوم المـائيـة ($Na_2SO_4.10H_2O$) او (13.2) غرام من كبريتـات الصـوديـوم الـلامـائيـة Na_2SO_4 في كمية من الماء ويكمل الحجم الى (1000) مللي لتر .

محلول كبريتات الزنك :

تذاب (10) غرامـات من كبريتـات الزنـك ($ZnSO_4.7H_2O$) في كميـة من المـاء ثم يكمل الحجم الى 100 مللي لتر .

محلول هيدروكسيد الصوديوم (0.5) عياري :

يجب ان تكون عيـاريـة هـذا المحلول مضبوطـة كما يجب تسحيحهـا مع كبريتـات الـزنـك ويلزم (10.8-11.2) مللي لتر لتكوين لون وردي ثابت مع الفينولفتـالين عنـد استخـدامهـا في تسحيح (10) مللي لتر من محلول كبريتات الزنك المحضر اعلاه وبعد تخفيفه بالمـاء الى (50) مللي لتر .

يوريا الدم بطريقة المونوكسيم

الطريقة :

أنبوب النموذج :- ضع في انبوب طرد مركزي 4.6 مللي لتر من محلول التخفيف سوى القوى (isotonic) مع (0.2) مللي لتر دم (مصل أو بلازما) ثم أضف (0.2) مللي لتر من محلول (0.5) عياري هيدروكسيد الصوديوم . أخلط جيداً بعد كل أضافة ثم ضع في جهاز الطرد المركزي لفصل البروتين عند 3000 لفة في الدقيقة لمدة 15 دقيقة .

خذ (2) مللي لتر من المحلول العلوي الرائق (في هذه المرحلة يكون تخفيف اليوريا $\frac{1}{25}$ عما في النموذج الاصلي) .

أنبوب القياسي :- = (2) مللي لتر من المحلول القياسي العامل تركيز 5 مليجرام/ 100 مللي لتر .

أنبوب الكفىء :- (2) مللي لتر ماء مقطر .

لكل الأنابيب أضف (2) مللي لتر كاشف دايستيل و (ا) مللي لتر حامض فوسفوريك - نتريك وأمزج جيداً وضع الانابيب لمدة 30 دقيقة في حمام مائي مغلي ثم برد تحت الصنبور بالماء البارد وأقرأ الكثافة الضوئية عند (480 مللي ميكرون) وأحسب تركيز اليوريا تبعاً لما يلي :-

$$\text{يوريا الدم ملي غرام/100 مللي لتر مصل} = \frac{\text{قراءة النموذج} - \text{قراءة الكفىء}}{\text{قراءة القياسي} - \text{قراءة الكفىء}} \times 5 \times 25$$

المحاليل :

محلول التخفيف : (43) مللي لتر من كبريتات الزنك 10% يكمل الى لتر مع كبريتات الصوديوم سوى القوي (أنظر تحت محاليل اليوريا) .

محلول اليوريا القياسي المخزون : (100 ملغم/100 مللي لتر ماء مقطر (أنظر تحت محاليل اليوريا) .

المحلول القياسي العامل : تركيز (5 مللي غرام لكل 100 مللي لتر) ويحضر بتخفيف 5 مللي لتر من القياسي المخزون الى 100 مللي لتر مع الماء المقطر .

محلول مونوكسيم الخليك : (2.5) غرام داى أستيل مونوكيم في (100) مللي لتر (5%) حامض الخليك .

كاشف داى ستيل : أخلط 100 مللي لتر من محلول داى أستيل مونوكسيم المخزون مع (25) مللي لتر من محلول اليوريا العامل مع اضافة (75) مللي لتر ماء مقطر .

حامض الفوسفوريك - النتريك : خليط من (600) مللي لتر حامض الفوسفوريك و (400) مللي لتر ماء مقطر مع (10) مللي لتر حامض النتريك المركز .

جدول (13) تقدير اليوريا بطريقة المونوكسيم

المحلول*	النموذج	الكفىء	القياس
محلول مخفف	4.6	—	—
دم او مصل بلازما	0.2	—	—
هيدروكسيد الصوديوم	0.2	—	—
	أترك لمدة 10 دقائق ثم ضع في جهاز الطرد المركزي لمدة 15 دقيقة عند 3000 لفة/دقيقة ثم انقل من المحلول العلوي الرائق 2 مللي لتر في انبوب جاف نظيف .		
المحلول العلوي الرائق	2	—	—
المحلول القياس	—	—	2
ماء مقطر	—	2	—
كاشف داي أستيل	2	2	2
مزيج حامض الفوسفوريك النتريك	1	1	1
	أمزج جيداً وضع الانابيب لمدة 30 دقيقة في حمام ماء يغلي ثم برد الانابيب تحت الصنبور وأقرأ اللون عند 480 مللي ميكرون .		

أحسب تركيز اليوريا طبقا للمعادلة الموضحة في التجربة .

* الحجوم الموضحة في الجدول بالمللي لتر .

اختبار تصفية اليوريا (urea clearance test)

يشابه هذا الاختبار ذلك بالنسبة لتصفية الكرياتنين حيث ان اليوريا ترشح في الكبيبات . ولكن اليوريا سريعة الانتشار (diffusable) بحيث اذا زادت كمية اليوريا في سائل الانابيب الكلوية عن كمية الماء في هذا السائل فان الزائد من اليوريا يعاد امتصاصه في الانابيب الكلوية ومن ثم فأن تصفية اليوريا أقل من تصفية الكرياتنين ـ عندما يكون هناك سريان جيد ومرتفع للبول (أكثر من (2) مللي لتر من الدقيقة) فان كمية اليوريا التي تمتص في الانابيب تصبح ثابتة وتحسب تصفية اليوريا بالطريقة الاعتيادية بتطبيق القانون ($\frac{U \times V}{P}$) = (C_m) ويطلق على (C_m) التصفية القصوى لليوريا (maximum clearance for urea) . وفي الاشخاص الطبيعين يصل المعدل الى (75) مللي لتر في الدقيقة (المدى 64 – 99) .

– اما اذا كان سريان البول اقل من (2) مللي لتر في الدقيقة فان هناك كمية اكبر من اليوريا يتم اعادة امتصاصها في الانابيب الكلوية ولقد حور القانون الى $\frac{U \times \sqrt{V}}{P}$ = C_s) ويطلق على (C_s) (standard clearance of urea) والذي يبلغ عند الاشخاص الطبيعين (54) مللي لتر في الدقيقة المدى (40–68) .

طريقة العمل :

يجب اجراء تقدير اليوريا في الدم اولا فاذا زادت عن (60) مللي غرام/ (100) مللي لتر فان هذا يعني انخفاض ترشيح الكبيبات ومن ثم فلا داعي لاجراء اختبار تصفية اليوريا . اما اذا كان اقل من ذلك فيجري الاختبار .

يسمح للمريض تناول فطور خفيف ويشجع على تناول كمية من الماء على حريته قبل واثناء الاختبار بحيث يصل معدل الشرب الى (250) مللي لتر في الساعة . ويفضل اجراء الاختبار قبل الظهر وعلى مدى (3) ساعات ويجمع نموذج من الدم في منتصف هذه الفترة وذلك لمعادلة اية تغير في معدل اليوريا في الدم .

ويتم تحليل اليوريا في الدم والبول كما موضح في طريقة تقدير اليوريا .

يخفف البول 50 مرة بالماء المقطر . وعند تطبيق طريقة اليوريز على الأدرار لتقدير اليوريا فأنه يجب عمل تصحيح للطريقة وذلك بسبب وجود كمية من الأمونيا والتي تطرح عادة في البول حيث تصل كميتها الى حوالي 1 غم يوميا . ولأجراء التصحيح في الطريقة فإنه يجب تحضير أنابيب إضافية لكل من كفىء الادرار ، كفىء الماء مع عدم استخدام او إضافة اليوريز لهذه الأنابيب وتحسب النتيجة كما يلي :-

mg يوريا في اليوم في الأدرار =

(قراءة الادرار مع اليوريز - قراءة الكفىء) - (كفىء الادرار - كفىء الماء)
____
(قراءة القياسي - قراءة الكفىء)

مضروباً في 100 × تخفيف الأدرار

ويتم حساب تصفية اليوريا القصوى والقياسية على حسب ما اذا كانت كمية البول اكثر او اقل من (2) مللي لتر في الدقيقة .

وفي القانون اعلاه :

(U) = تركيز اليوريا في البول بالمللي غرام / (100) مللي لتر

(V) = حجم البول في الدقيقة

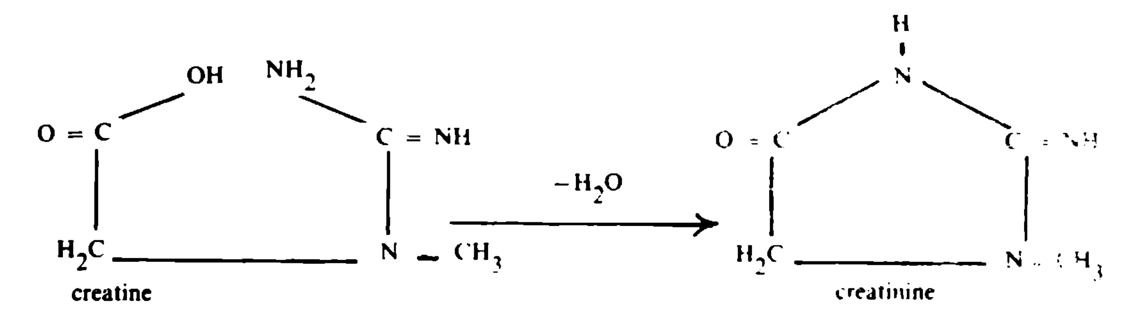
(P) = تركيز اليوريا في الدم بالمللي غرام / (100) مللي لتر

تقدير الكرياتين والكرياتنين في بلازما الدم والادرار

(Determination of creatinine and creatine in plasma and urine)

معلومات عامة :

يمكن تقسيم المواد التي تحتوي على النتروجين الى مركبات نتروجينية بروتينية واخرى غير بروتينية . وينتمي الكرياتنين الى المجموعة الثانية اي الى النتروجينات غير البروتينية . انه منتوج عديم الفائدة (waste product) ويطرح من الدم بالبول بواسطة الكليتين وتنشأ الكرياتنين من الكرياتين بعد فقدان جزيء ماء من الاخير ويمثل ذلك بالمعادلة الآتية :-



ويتكون الكرياتين في الكبد وينقل بواسطة الدم الى العضلات حيث يخزن على شكل كرياتين فوسفات الذي يساعد على توفر الطاقة للعضلات لاداء وظائفها وعند انطلاق الطاقة يتحول الى كرياتنين ويطرح الى مجرى الدم حيث يزال بواسطة الكلية .

ان مستوى الكرياتنين في مصل الدم يعتبر ثابتاً الى حد كبير وهو أقل المواد النتروجينية الموجودة في الدم تغيرا كما وان الكمية المطروحة يومياً تكاد تكون ثابتة من يوم الى آخر في الشخص الطبيعي الواحد وتتغير كمية الكرياتنين في الدم في عدد من الحالات المرضية حيث تزداد في حالات التهاب الكلية او أنسداد المجاري البولية ويطرح الفرد البالغ في اليوم الواحد مايتراوح بين (700–2500) مللي غرام في البول ولما كانت الكمية التي تتطرح تتوقف على كتلة العضلات (muscle mass) في الجسم فانه من الافضل التعبير عن الكرياتنين المطروح بالبول بالنسبة لحجم الجسم وطبقاً لذلك فأن القيم الطبيعية عند الرجال تصل من (20) الى (26) مللي غرام/كيلو غرام من وزن الجسم خلال (24) ساعة وتصل هذه الكمية عند النساء من (14) الى (22) مللي غرام/كيلو غرام من وزن الجسم خلال (24) ساعة ويساعد تقدير مستوى الكرياتينين في مصل الدم على تشخيص امراض الكلية والجهاز البولي وكذلك تقدير مدى أصابة هذه الاعضاء والانسجة .

في حالة وجود خلل في وظائف الكلية وفي حالة زيادة كمية اليوريا في الدم (uraemia) يتراكم الكرياتينين في الدم ويصبح مستواه في البلازما مرتفعاً .

ان الكشف على وجود ارتفاع بسيط قد يشير الى ان المريض لم يزل في مراحله الاولى وفي الاشخاص الطبيعين يصل مدى الكرياتينين في مصل الدم من (0.3) الى (1.1) مللي غرام/(100) مللي لتر (والمدى عند النساء اقل بقليل عنه عند الرجال) ومن الضروري الاشارة الى ان الكرياتينين في نموذج مصل الدم يتحطم (decomposes) عند درجة حرارة الغرفة وكذلك عند درجات المنخفضة الاعلى من (4) ولذلك كان لابد من تخزن المصل او البول لفترة طويلة فيجب حفظ النماذج مجمدة عند درجة (–20 –30)م للحصول على نتائج يمكن الاعتماد عليها .

طريقة التقدير :

ان افضل الطرق المتبعة لتقدير الكرياتنين في السوائل البيولوجية (مصل الدم والبول) هي الطريقة التي تعتمد على تفاعل (Jaffe) والتي تعتمد على اضافة بيكرات الصوديوم (sodium picrate) في محلول قلوي الى رشيح البلازما او البول بعد ازالة البروتينات وينتج عن تفاعل الكرياتنين مع بيكرات الصوديوم مركب بيكرات الكرياتنين ذو اللون الاحمر وبقياس تركيز هذا اللون الاحمر ويمكن معرفة كمية الكرياتنين في النموذج بالمقارنة مع لون محلول قياسي من الكرياتنين معامل بنفس الطريقة . ويعتقد ان التفاعل بين الكرياتنين وبيكرات الصوديوم لاعطاء المركب الاحمر يجري طبقاً للمعادلة :-

creatinine + picric acid → red creatinine-picrate complex

جمع نموذج الدم :

أجمع (5–6) مللي لترات من الدم الوريدي مع استخدام مادة الهيبارين لمنع التخثر للحصول على بلازما الدم . آنبذ واستعمل البلازما مع ضرورة خلوها من أية آثار لتحلل

كريات الدم الحمراء . كما يلاحظ انه يمكن استعمال مصل الدم . افحص النموذج في اقصر وقت والا فخزن عند - (20) - (30)°م .

طريقة العمل عند تقدير الكرياتنين في بلازما الدم :

1 - ترسيب البروتينات :

استخدم قارورة مخروطية (Erlenmeyer flask) سعة (50) او (100) مللي لتر وضع بها :-

- (2) مللي لتر من البلازما الدم مستعملاً ماصة حجمية (اي ماصة سعة (2) مللي لتر)
- (14) مللي لتر من الماء المقطر واخلط بالتدوير .
- (2) مللي لتر من محلول حامض الكبريتيك تركيز $\frac{2}{3}$ عياري واخلط بالتدوير .
- (2) مللي لتر من تنكستات الصوديوم تركيز (10%) ثم اغلق القارورة ورج جيداً .
- رشح في انبوب اختبار كبير (والرشيح يكفي لاجراء الفحص مزدوج . ولاحظ ان نموذج البلازما قد تم تخفيفه بنسبة (1 : 10) .

محلول البكريت القاعدي :

يحضر فوراً قبل الاستعمال . هيء اولاً انابيب الكفيء والقياسي والنموذج تحت الفحص ثم حضر محلول البكريت القلوي اللازم للتجربة طبقاً للاحتياج واستخدمه فوراً . ويحضر محلول البكريت القلوي بالنسبة الآتية :

- (5) حجوم من محلول حامض البكريك المشبع في الماء (خالي من بلورات حامض البكريك المعلقة) .
- (1) حجم من محلول هيدروكسيد الصوديوم تركيز (10%) .
- اخلط جيداً واستعمل المحلول فوراً حيث ان لونه يتغير اذا ترك معرضاً للجو لمدة (10) دقائق .

تحضير انابيب الكفيء والقياسي :-

الكفيء : ضع في انبوب اختبار - (5) مللي لتر من الماء المقطر .

القياسي : يتم تهيئة انبوبتين قياسيتين ذات تراكيز مختلفة وذلك للتأكد من صحة المنحني التقنيني او المنحني القياسي (standard or caliberation curve) الانبوب القياسي الاول ويحتوي على (1) مللي لتر من المحلول القياسي المخفف (0.01) مللي غرام/مللي لتر) واضف له (4) مللي لتر من الماء المقطر .

الإنبوب القياسي الثاني ويحتوي على (2) مللي لتر من المحلول القياسي المخفف (اي 2x0.01 مللي غرام من الكرياتنين) واضف (3) مللي لتر من الماء المقطر .

انابيب النموذج تحت الفحص (مزدوج) : اضف في الانبوب (5) مللي لتر من الرشيح الخالي من البروتينات الى جميع الانابيب المحضرة اعلاه اضف (2.5) مللي لتر من محلول البكريت القلوي والمحضر طازجاً وأخلط بعد كل أضافة مباشرة .

دع الانابيب تستقر لمدة عشرين دقيقة ويفضل في الظلام واقرأ اللون في جهاز مقياس اللون عند الموجة الضوئية (520mu) مللي ميكرون بعد ضبط الجهاز على نقطة صفر مستخدماً الانبوب الكفيء ، من قراءات الكثافة الضوئية للنموذج والمحاليل القياسية واحسب قيم الكرياتنين ويجب ملاحظة ضرورة تتطابق قراءات انابيب المحلول القياسي مع نظائرها على المنحني القياسي والذي يدل على صحة المحاليل ودقة العمل .

جدول (14) تقدير الكرياتينين في الدم أو المصل

المحلول*	النموذج	الكفيء	القياس
بلازما أو مصل	2	—	—
ماء مقطر	14	—	—
حامض كبريتيك 2/3 ع	2	—	—
تنجستات الصوديوم	2	—	—
	أخلط جيداً ثم ضع في جهاز الطرد المركزي لمدة 10 دقائق عند 3000 لفة/دقيقة أو رشح .		
المحلول العلوي الرائق	5	—	—
ماء مقطر	—	5	4
محلول قياس	—	—	1
محلول البكريك القاعدي	2.5	2.5	2.5
	أخلط جيداً وأترك الانابيب لمدة 20 دقيقة في الظلام واقرأ اللون عند 520 مللي ميكرون .		

طبق طريقة الحساب كما هو موضح في التجربة .

الحجوم الموضحة في الجدول بالمللي لتر .

الحساب :

$$\frac{ف - ك}{س - ك} \times (\frac{100}{0.5}) \times ح = \text{ مللي غرام \%}$$

ف = قراءة انبوب الفحص

س = قراءة انبوب القياس ، ك = قراءة الانبوب الكفىء ، ح = تركيز القياس

ملحوظة :

(0.5) = حجم البلازما المقابل لخسة مللي لتر من الراشح بعد ترسيب البروتينات ، (100) = لحساب التركيز في (100) مللي لتر من بلازما الدم .

وللتحويل الى وحدات دولية Mmol/L/ أضرب بالمعامل 88.4 .

بناء منحني قياسي للاستخدام في تقدير الكرياتنين في بلازما الدم

رقم الانبوب	كمية المحلول القياسي العامل	water	كمية بكريت القلوي (مللي لتر)	الكثافة الضوئية (ك.ض)	كمية الكرياتنين بالانبوب (مللي غرام%)
Blank	0.0	5	2.5		Zero
1	0.5	4.5	2.5		1.0
2	1.0	4.0	2.5		2.0
3	1.5	3.5	2.5		3.0
4	2.0	3.0	2.5		4.0
5	2.5	2.5	2.5		5.0
6	3.0	2.0	2.5		6.0
7	3.5	1.5	2.5		7.0

تقدير الكرياتينين في البول :

تستخدم نفس الطريقة التي تم شرحها لتقدير الكرياتينين في مصل الدم ولكن يجب الاخذ في الاعتبار النقاط التالية :-

1) ان تركيز الكرياتينين في الادرار يبلغ خمسين ضعف تركيز الكرياتينين في مصل الدم .

2) عادة البول خالي من البروتينات .

ولذلك فيجب تخفيف نموذج بول (50:1). وحيث ان مصل الدم يعامل لترسيب البروتينات مما يؤدي الى تخفيف نموذج المصل بنسبة (1–10) كما سبق ايضاحه في التجربة فللحصول على قراءات للبول متناظرة مع تلك لمصل الدم يجب اخذ هذا التخفيف في الاعتبار ايضاً وبذا يجب ان يكون تخفيف نموذج البول الخالي من البروتينات بمعدل (500:1) اما بالنسبة للبول الذي يحتوي على بروتينات فيمكن ترسيب الاخيرة بمعالجة (0.1) مللي لتر من البول باضافة (10) مللي لتر من حامض ثلاثي كلوريد الخليك تركيز (20%) (يصبح التخفيف (100:1) ثم يرفع الحجم بعد فصل البروتينات باستخدام جهاز الطرد المركزي الى خمسة اضعاف ليصبح التخفيف (500:1) وفي حالة انخفاض كمية الكرياتينين في نموذج البول يكون التخفيف بنسبة (50:1) او بنسبة (100:1) مع اخذ ذلك في الاعتبار عند الحساب .

ويعالج نموذج البول بعد التخفيف تماماً مثل البلازما ويمكن ان يقدر الكرياتينين في البول في نفس الوقت الذي يتم فيه الفحص على نماذج البلازما .

فقط يجب تجنب تلوث البلازما بالبول حيث ان البول يحتوي على كمية كرياتنين أكبر بكثير من البلازما كما يجب المحافظة على نماذج البول وحتى الانتهاء من التجربة تماماً وحساب النتائج حيث ان نموذج الادرار الواحد لايمكن تعويضه لتغير تركيز الكرياتنين في البول من نموذج الى آخر حسب المجهود الذي يبذله الشخص وكمية الماء المتناولة وكذلك على نوعية الغذاء وعوامل أخرى .

طريقة العمل على البول :

دون حجم بول (24) ساعة وأخلط النموذج جيداً وخفف كمية من البول بالماء المقطر في قارورات حجمية كما يلي :-

أ - (1 : 50) 1 مللي لتر بول + (49) مللي لتر ماء مقطر .

ب - (100:1) (1) مللي لتر بول + (99) مللي لتر ماء مقطر .

1 - حول بماصة (1) مللي لتر من البول الى قارورتين سعة كل منها (100) مللي لتر .
2 - حول بماصة (1) مللي لتر من محلول القياسي والذي يحتوي على (1) مللي غرام/(100) مللي لتر الى قارورتين حجميتين اخرتين سعة كل منهما (100) مللي لتر .
3 - حول بماصة الى قارورة اخرى ذات نفس السعة (1) مللي لتر من الماء المقطر ويستخدم هذا الانبوب ككفيء .
4 - اضف الى كل قارورة (1) مللي لتر من محلول هيدروكسيد الصوديوم (1) عياري وامزج جيداً واتبع ذلك . باضافة (2) مللي لتر من محلول البكريك المشبع .

5 - دع القارورات لتستقر لمدة عشر دقائق بالضبط .

6 - وفوراً بعد هذه الفترة الزمنية اكمل الى العلامة (100) مللي لتر مستخدماً الماء المقطر .

7 - اقرأ اللون عند (520 مللي ميكرون) .

جدول (15) تقدير الكرياتينين في البول

المحلول*	البـــول		الكفء	القياس
	فيه بروتين	خالي من البروتين		
بول فيه بروتين	0.1	—	—	—
حمض ثلاثي كلور الخليك	9.9	—	—	—
	يمزج جيداً ويترك لمدة 5 دقائق ويوضع في جهاز			
	الطرد المركزي لمدة 10 دقائق عند 3000 لفة/دقيقة			
	ثم تنقل 0.2 مللي لتر من المحلول العلوي الرائق .			
المحلول العلوي الرائق	0.2	—	—	—
بول خالي من البروتين (مخفف 1:500)	—	1	—	—
محلول قياسي	—	—	—	1
ماء مقطر	0.8	—	1	—
هيدروكسيد الصوديوم	1	1	1	1
محلول بكريك مشبع	2	2	2	2
	أخلط وأترك القارورات لمدة 10 دقائق ثم أضف .			
ماء مقطر	96	96	96	96
	أخلط جيداً وأقرأ اللون عند 520 مللي مايكرون .			

طبق طريقة الحساب الموضحة في التجربة .

* الحجوم الموضحة في الجدول بالمللي لتر .

الحساب :

بعد قراءة الكثافة الضوئية جد كمية الكرياتنين التي تعادلها بالمللي غرامات٪ بالرجوع الى المنحنى القياسي لتقدير الكرياتنين في بلازما الدم وأضرب النتيجة في 50 بالنسبة الى (1 : 50) في (أ) ، أضرب النتيجة في (100) بالنسبة لتخفيف (1:100) في (ب) وبذا تحصل على تركيز قيمة الكرياتنين في البول بالمللي غرامات لكل (100) مللي لتر من البول الاصلي .

واذا كان الادرار قد تم جمعه لفترة (24) ساعة فأن كمية الكرياتنين التي تطرح في البول خلال هذه الفترة يمكن حسابه ، يتضح من النموذج الحسابي التالي :-

نفترض ان حجم البول (24) ساعة = (1160) مللي لتر .

تركيز الكرياتنين في البول مللي غرام/(100) مللي لتر تساوي 130 مللي غرام ، اذن الكرياتنين المطروح بالبول خلال ؛

$$(24) \text{ ساعة } = \frac{(1160) \times (130)}{(100)}$$

$$= (1510) \text{ مللي غرام}$$

مصادر الخطأ عند تقدير الكرياتنين :

إن الاسيتون يعطي تفاعل (jaffe) فيجب عدم استخدام الاسيتون في تنظيف الادوات الزجاجية . كما يعطي البروتين تفاعل (jaffe) ولذا يجب ان يكون الراشح صافياً وخالياً تماماً من البروتينات .

المحاليل :

محلول حامض الكبريتيك 2/3 عياري :-

حول بالضبط (19) مللي لتر من حامض الكبريتيك المركز الى قارورة حجمية سعة لتر واحد حاوية على حوالي (700)مللي لتر من الماء المقطر واخلط بهدوء واترك المحلول ليبرد ثم أكمل الحجم الى لتر بالماء المقطر باستعمال الفينولفتالين كمؤشر، فأن (20)مللي لتر من المحلول الحامض المحضر والمذكور اعلاه يعادل مع (13.33)مللي لتر من محلول هيدروكسيد الصوديوم واحد عياري. فأن كان المحلول أكثر حمضية اضبط العياري الى (2/3) عياري بالتخفيف .

محلول تنكستات الصوديوم تركيز (10%) :

أوزن (100) غرام من تنكستيك الصوديوم ($Na_2WO_4\ 2H_2O$) وحولها الى قارورة حجمية سعة لتر واحد . ذوب وخفف الى الحجم مع الماء المقطر . اغلق واخلط جيداً واحفظ في قنينة زجاجية من نوع بيركس (Pyrex) او من مادة بولى اثيلين (polyetylene bottle) .

محلول حامض البكريك المشبع :

سخن لتر واحد من الماء المقطر ليغلي في قارورة او دورق سعة لترين . ارفع القارورة بعيداً عن مكان اللهب واترك ليبرد قليلاً ثم اضف (11.75)غرام من حامض البكريك واذب مع التحريك الهادىء ثم دع المحلول ليبرد الى حرارة الغرفة ومن ثم رشح واحفظ في قنينة بنية اللون ذات سداد زجاجي .

ملاحظة :-

يحتوي الحامض البكريك التجاري على رطوبة تصل الى (10-12) من الماء ويجب اذا جف الماء من على الحامض في عبوته الاصلية اضافة كية من الماء منعاً لحدوث انفجار عند ارتفاع درجة حرارة الجو .

محلول هيدروكسيد الصوديوم تركيز (10%)

تحضير محاليل هيدروكسيد الصوديوم المخففة من محلول مشبع خالي من الكاربونات ومعروف التركيز واذا كانت عيارية المحلول المركز معروفة بالضبط فعندئذ يمكن تخفيف الحجم المناسب لعمل محلول مخفف بموجب المعادلة التالية :-

$ح_1 \times ع_1 = ح_2 \times ع_2$

حيث ح1 ، ع1 = حجم وعيارية المحلول المركز .

ح2 ، ع2 = حجم وعيارية المحلول المخفف .

1 - تحضير المحلول القياسي المخزون (1 مللي غرام/ 1 مللي لتر من المحلول) :

زن في ميزان دقيق (1) غرام من الكرياتينين (في حالة استخدام كلوريد زنك الكرياتينين زن (1.6026) غرام بالضبط) . ذوب في كية من محلول الهيدروكلوريك (0.1) عياري واكمل الى (1000) مللي لتر بحامض الهيدروكلوريك بنفس التركيز .

تحضير القياسي المتداول (0.01) مللي غرام/ (مللي لتر) :

خفف (10) مللي لترات من محلـول القيــاسي للكريــاتنين المخــزون الى (100) مللي لتر بحامض الهيدروكلوريك (0.1) عياري حضر وجهز انابيب القياس كما موضح في الجـدول الســابق ذكره ودع اللـون يكتمـل في عشرين دقيقـة وبـدرجـة حرارة الغرفـة واقرأ الكثـافـة الضـوئيـة (ك.ض) عنـد (520 mu) وسجـل القراءات في حقـل الكثـافـة الضـوئيـة مـع مـايعــادلهــا من الكرياتنين مللي غرام على ورقة خط بياني اعتياديـة لتحصل على المنحني القيـاسي والـذي يمكن الرجوع اليه لحساب كميات الكرياتنين المقابلة لقراءة النماذج تحت الفحص .

اختبار الكلية لتصفية وتنقية الدم (renal clearance test)

ان الكلية تقوم بعدد من الوظائف الحيوية بالجسم ومن أهمها المحافظة على كمية الماء بالجسم وكذلك المواد الضرورية التي يحتاجها الجسم كما وانها من جهة اخرى لها القدرة على طرح بعض الفضلات والمواد الضارة الموجودة في الدم والتي لايكون الجسم في حاجة اليها او اذا بقيت في الجسم قد ينتج عن وجودها آثار سيئة بالصحة ومن ثم فأن هناك جهد كبير من جانب العلماء للكشف على طرق مختبرية يمكن ان تساعد وتلقي الضوء على نشاط الكلية ومدى قدرتها على القيام بوظائفها المختلفة .

ومن أهم الاختبارات التي تجري على نطاق واسع في عديد من المختبرات هي دراسة مدى كفاءة الكلية على طرح المواد غير الضرورية او الضارة بالجسم ويطلق على مجموعة هذه الاختبارات اسم اختبارات الكلية في التصفية (Kidney function clearance test) ، ومن بين هذه الاختبارات .

أ – تصفية الكرياتنين (Creatinine clearance) :-

تعرف التصفية الكلوية لاي مركب بانه عدد المللي لترات من مصل او بلازما الدم التي يتم تصفية المركب منها بواسطة الكلية وطرحها بالبول خلال دقيقة واحدة .

ولأجراء اختبار قدرة الكلية على تصفية مادة من الدم تحتاج الى عينة من البول موقوتة بزمن محدود وبدقة ويتم قياس حجم البول وحساب العلاقة حجم دقيقة (اي كمية البول التي تطرح في دقيقة واحدة) كما يتطلب ايضاً الحصول خلال نفس الفترة الموقوتة على نموذج من البلازما او المصل .

2 – يعتبر اختبار تصفية الكرياتنين اختبار معول عليه للوظيفة الكلوية وحيث ان قيم الكرياتنين ثابتة تقريباً في الدم ولكن تختلف من نموذج بول الى آخر فعليه من المفضل والضروري عمل اختبار التصفية على نموذج بول (24) ساعة .

الاجراء :

أ – يتم جمع البول اعتيادياً من قبل الممرضة ومن المهم ان يكون التوقيت مضبوطاً تماماً (مثلاً من الساعة 8 صباحاً الى الساعة 8 من صباح اليوم التالي) ويجمع جميع البول المطروح خلال هذه الفترة ، ويجب حفظ النموذج في الثلاجة خلال فترة الجمع ، ويجوز اضافة قطرات قليلة من التولوين كمادة حافظة . وفي نهاية فترة الـ (24) ساعة التي يجمع خلالها البول يتم خلط النموذج جيداً ويقاس الحجم بالضبط وعندئذ يمكن حساب حجم البول المطروح في الدقيقة الواحدة .

ب - يجمع نموذج دم في اي وقت خلال فترة الـ (24) ساعة ويفضل ان يكون في منتصف اليوم (اي بعد «12» ساعة من بدأ جمع البول) .

جـ - يتم تعيين تركيز الكرياتنين في نموذج البول وكذا في نموذج مصل الدم او البلازما بالطريقة المذكورة سابقاً لتقدير الكرياتنين .

الحساب :

$$\text{ت}_\text{ك} = \frac{\text{ب}_\text{ك} \times \text{ح}}{\text{م}_\text{ك}}$$

تك = تصفية الكرباتنين (مللي لتر/دقيقة)

بك = تركيز الكرياتنين في البول (مللي غرام/(100) مللي لتر) .

مك = تركيز الكرياتنين في مصل الدم او البلازما (مللي غرام/(100) مللي لتر)

ح = حجم الادرار في الدقيقة الواحدة .

حامض البوليك :

يعتبر حامض البوليك المنتج النهائي في عملية تمثيل مجموعة من المواد البيولوجية النيتروجينية والتي تعرف بالبيوريتز (purines) وتتوفر البيوريتز في الاحماض النووية (nucleic acids) التي تدخل في تركيب البروتينات النووية . ومن هنا جاءت التسمية بهذا الاسم لكثرة وجودها في نواة الخلية . ويتكون جزء من البيوريتز داخل الجسم (endogenous) عند تكوين البروتينات النووية داخل نواة الخلية في حين يتوفر الجزء الآخر من البيوريتز مع مصادر الغذاء لم يستقر الرأي بعد على المستوى الطبيعي لحامض البوليك في الدم فهناك بعض الاختلاف في المعدلات التي تعبر عن المدى الطبيعي او الاعتيادي عند الاشخاص الاصحاء .
والقيم الاعتيادية التي يؤخذ بها حديثاً هي (2–7) مللي غرام لكل (100) مللي لتر وأن المستوى عند الاناث يقل (1) مللي غرام عنه عند الذكور ويتركز انتباه واهتمام العلماء بما يحدث من تغير في مستوى حامض البوليك في الدم وبصفة خاصة عند مرض النقرس (داء الملوك gout) حيث ان هذه الحالة المرضية تتميز بوجود زيادة كبيرة في حامض البوليك في الجسم . وينتج عن ذلك ترسيب كمية من البيورين كبلورات صلبة داخل او في الانسجة القريبة او المحيطة بالمفاصل كما يصاحب ذلك غالباً زيادة في مستوى الحامض في الدم ويصل معدله (6.5–12) مللي غرام لكل (100) مللي لتر .
ومن جهة اخرى فانه قد لوحظ حدوث زيادة كبيرة في كمية حامض البوليك في الدم في الحالات التي يحدث بها خلل في وظائف الكلية وخاصة عندما تكون مصحوبة بارتفاع اليوريا في الدم ويصل معدل حامض البوليك في الدم مثل هذه الحالات الى (20) مللي غرام في كل (100) مللي لتر كما لوحظ ارتفاع كبير في مستوى حامض البوليك في حالات اللوكيميا (leukemia) وفي كثير من الاحيان يصل معدل الارتفاع في حامض البوليك في الدم الى (10) مللي غرام/(100) مللي لتر من الدم ويرجع ذلك غالباً الى تكسير الخلايا وتحلل النواة .

طرق التقدير :

تعتمد اغلب الطرق على اختزال حامض فولن فوسفو تنجستيك (Folin phosphotungstic acid) بواسطة حامض البوليك في النموذج الى مادة زرقاء تعرف تنجستن الازرق (tungsten blue) وقد لوحظ ان وجود كميات قليلة من ساينيد الصوديوم واليوريا تسرع في ظهور اللون الازرق وتزيد من حساسية الطريقة وتجعلها أكثر دقة ولكنها ليست شائعة الاستعمال لسمية السيانيد وفي طرق اخرى يتم التفاعل بين حامض البوليك وحامض فوسفوتنجستيك في وجود هيدروكسيد الصوديوم وكاربونات الصوديوم . ومع ذلك فأن جميع الطرق لها عيب مشترك الا وهو ان بعض المواد الموجودة في الدم غير حامض البوليك وذلك

مثل حامض الاسكوربيك (فيتامين ج) تتفاعل وتعطي لوناً أزرق مع كاشف فولن .

وهناك طريقة اخرى حديثة دقيقة ولكنها تتطلب خبرة وتوفر نوع خاص من الاجهزة وهي تعتمد على ان حامض البوليك يظهر قمة في طيف الامتصاص في المنطقة فوق البنفسجية وعند الموجة الضوئية (290 مللي مايكرون) ويمكن استخدام هذه الخاصية في تعيين كمية حامض البوليك عن طريق التغير في الكثافة الضوئية في النموذج قبل وبعد تكسير حامض البوليك تحت تأثير اضافة انزيم اليوريكيز .

طريقة الكاربونات :

خطوات العمل :

- حول بماصة (1.0) مللي لتر من المصل الدم والخالي من اي آثار لتحليل كريات الدم الى انبوب منبذة (يجري الفحص مزدوج) ثم اضف (1) مللي لتر من الماء المقطر واخلط . أضف (8) مللي لتر من حامض التنكستك مرتفع التركيز (full strength) وأخلط جيداً . ثم انبذ حول (5) مللي لتر من السائل الطافي الصافي من الانابيب المزدوجة الى انابيب مقابلة - وفي انبوب ثالث اضف (5) مللي لتر من الماء المقطر لتستخدم كانبوب كفيء وفي انبوب رابع وخامس اضف في كل منهما (5) مللي لتر من المحلول القياسي . ثم أضف لكل أنبوب ذكر اعلاه (1.0) مللي لتر من محلول كاربونات الصوديوم تركيز (10%) وأخلط جيداً ثم أضف (1) مللي لتر من حامض فوسفوتنجستيك المخفف وأخلط واترك الانابيب في وضع مستقر لمدة ثلاثين دقيقة . قس الامتصاص الضوئي عند موجة الضوئية (700 مللي ميكرون) خلال العشرين دقيقة التالية مستخدماً الانبوب الكفيء في ضبط الجهاز .

الحساب :

$$\text{حامض البوليك في مصل الدم} = \frac{\text{الكثافة الضوئية للنموذج}}{\text{الكثافة الضوئية للمحلول القياسي}} \times \left(0.025 \times \frac{100}{0.5}\right)$$

حيث : (0.025) هي تركيز المحلول القياسي (مللي غرام/(5) مللي لتر) المستخدمة في التجربة)
(100) = للحصول على تركيز في (100) مللي لتر من مصل الدم .
(0.5) = كمية المصل أستخدم في الاختبار .

وللتحويل الى وحدات دولية (مللي مول/لتر) أضرب بالمعامل 59.5 .

جدول (16) تقدير حامض البوليك في مصل الدم

المحلول*	النموذج	الكفيء	القياس
مصل الدم	1.0	—	—
ماء مقطر	1.0	—	—
حامض التنجستيك	8.0	—	—
	أخلط جيداً واترك لمدة 10دقائق ثم وضع في جهاز الطرد المركزي لمدة 10 دقائق عند 3000 لفة/دقيقة ثم انقل من المحلول العلوي الرائق الى انبوب جاف ونظيف .		
المحلول العلوي الرائق	5	—	—
ماء مقطر	—	5	—
محلول قياسي	—	—	5
كربونات الصوديوم	1	1	1
	أخلط جيداً وأضف .		
حامض فوسفوتنجستيك مخفف	1	1	1
	أخلط جيداً وأترك لمدة 5 دقائق ثم أقرأ اللون عند 700 مللي ميكرون .		

طبق طريقة الحساب الموضحة في التجربة .

* الحجوم الموضحة في الجدول بالمللي لتر .

المحاليل :

محلول حامض التنكستيك كامل القوة او مرتفع التركيز

اضف (100) مللي لتر من محلول حامض التنجستيك ($Na_2WO_4.2H_2O$) تركيز (10%) وكذلك (o.1) مللي لتر حامض الفوسفوريك تركيز (85%) الى (700) مللي لتر من الماء المقطر . اخلط ثم اضف مع المزج الجيد (100) مللي لتر من محلول حامض الكبريتيك (0.67) عياري هذا المحلول ثابت (stable) في درجة حرارة الغرفة .

محلول كاربونات الصوديوم :

ضع حوالي (50) مللي لتر من الماء المقطر في قارورة ثم أضف (10) غرامات من كاربونات الصوديوم اللامائية - ذوب ثم برد واكمل الحجم الى (100) مللي لتر بالماء المقطر .

محلول كاشف دنيس (Folin–Denis phosphotungstic acid reagent)

ذوب (100) غرام من تنجستات الصوديوم الخالية من المولبيدات في (800) مللي لتر من الماء المقطر ثم اضف (80) مللي لتر من حامض الفوسفوريك تركيز (85%) وسخن تحت مكثف عائد (reflux condenser) واغلي بهدوء لمدة ساعتين ثم برد واكمل الى لتر بالماء المقطر . أخلط المحلول جيداً وأحفظ في قنينة وهذا الكاشف دائم الثبات (stable indfinitely) .

محلول حامض الفوسفوتنجستك المخفف :

خذ (10) مللي لتر من محلول كاشف فولين دنيس السابق وصفه اعلاه وخفف الى (100) مللي لتر بالماء المقطر .

محلول قياسي حامض البوليك المخزون (stock) :

تركيز (20) مللي غرام / (100) مللي لتر .

ضع (100) مللي غرام من حامض البول ك النقي في قارورة حجمية سعة (500) مللي لتر وفي اناء آخر ذوب مستقلاً (2.3)غرام من كاربونات الصوديوم اللامائية في (300) مللي لتر من الماء المقطر الحار .

ثم حوله الى القارورة الحجمية التي تحتوي على حامض البوليك وامزج جيداً لحين ذوبان حامض البوليك تماماً ثم برد واضف (0.9) مللي لتر من حامض الخليك الجليدي واكمل الحجم الى (500) مللي لتر بالماء المقطر .

محلول قياسي حامض البوليك العامل (working) :

تركيز (0.5) ملي غرام / (100) ملي لتر .
اضف (5) ملي لترات من محلول القياسي لحامض البوليك المخزون الى حوالي (100) ملي لتر من الماء المقطر في قارورة حجمية سعة (200) ملي لتر ثم اكمل الحجم بالماء المقطر .

ملاحظة :

لقد تم حديثاً تطوير طريقة لتعيين حامض البوليك بدمج طريقة الكربونات مع اليوريكيز وهي تعطي مايعرف بحامض البوليك الحقيقي (true uric acid) نظراً لألغاء تدخل اية مادة اخرى في الفحص .

تقدير حامض البوليك في البول :

تتبع نفس الطريقة ولكن يجب تخفيف نموذج البول نظراً لأن تركيز حامض البوليك في البول يبلغ عشرة امثال ماهو في مصل الدم . كما يجب الاخذ في الاعتبار نسبة (10:1) الناتجة عند ترسيب البروتينات من مصل الدم وبذا فأن نموذج البول يخفف بنسبة (100:1) قبل التشغيل بأستخدام الماء المقطر تسجل النتائج بالمللي غرام/بول (24) ساعة اي (ملي غرام/اليوم) يطرح الاصحاء مايتراوح بين (800–600 milligrams) ملي غرام حامض اليوريك في البول خلال (24) ساعة .

. حامض البوليك المصل (Serum Uric Acid) الطريقة الموحدة

الطريقة :-

ضع (0.6) مللي لتر من مصل الدم في أنبوبة جهاز الطرد المركزي أضف له (0.4) مللي لتر حامض الكبريتيك و (0.4) مللي لتر تنجستات الصوديوم و (4.6) مللي لتر ماء مقطر أمزج جيداً واتركه ساكناً لمدة 10 دقائق وضعه في جهاز الطرد المركزي 2000 دورة في الدقيقة ولمدة 15 دقيقة ، جهز ثلاث انابيب اختبار :

1) الفحص :ضع (3) مللي لتر من المحلول العلوى الرائق الذي تم فصله باستخدام جهاز الطرد المركزي .
2) الكفىء :ضع (3) مللي لتر ماء مقطر .
3) القياسي :ضع (3) مللي لتر من المحلول القياسي العامل لحامض البوليك .

أضف الى كل أنبوب (0.6) مللي لتر من محلول كربونات الصوديوم (10%) وأخلط جيداً ثم أضف (0.6) مللي لتر من محلول فوسفوتنجستك المخفف واخلط واترك الانابيب في وضع مستقر في درجة حرارة الغرفة لمدة ثلاثين دقيقة لاستكمال التفاعل اللوني . .

قس الكثافة الضوئية عند الموجة الضوئية (700 مللي ميكرون) خلال العشرين دقيقة التالية مستخدماً الانبوب الكفىء في ضبط الجهاز على الصفر .

الحساب :-

$$\frac{\text{الكثافة الضوئية للنموذج}}{\text{الكثافة الضوئية للمحلول القياسي}} \times \frac{100}{0.3} \times 0.015$$

$$\frac{\text{الكثافة الضوئية للنموذج}}{\text{الكثافة الضوئية للمحلول القياسي}} \times 5$$

وللتحويل الى وحدات دولية m.mol/L أضرب بالمعامل 59.5

المحاليل :-

1 - محلول تنجستات الصوديوم (10%) (أنظر تحت محاليل حامض البوليك)
2 - $2/3$ عياري حامض الكبريتيك .
3 - محلول حامض التنجستك (أنظر تحت محاليل حامض البوليك) .
4 - محلول قياسي حامض البوليك المخزون (100) ملغم من حامض البوليك في (100) مللي لتر ماء مقطر .
5 - محلول حامض البوليك القياسي العامل تركيز (0.005) ملغم/مللي لتر . ويحضر باضافة (1) مللي لتر من الماء المقطر في قارورة حجمية سعة (200) مللي لتر ثم أكمل الحجم بالماء المقطر .

جدول (17) تقدير حامض البوليك في مصل الدم بالطريقة الموحدة

المحلول*	النموذج	الكفىء	القياس
مصل الدم	0.6	—	—
حامض الكبريتيك	0.4	—	—
تنجستات الصوديوم	0.4	—	—
ماء مقطر	4.6		
	أمزج جيداً واترك لمدة 10 دقائق ثم ضع في		
	جهاز الطرد المركزي لمدة 10 دقائق عند		
	3000 لفة/دقيقة ثم انقل 3 مللي لتر من المحلول		
	العلوي الرائق الى أنبوب جاف ونظيف .		
المحلول العلوي الرائق	3	—	—
ماء مقطر	—	3	—
محلول قياسي	—	—	3
كربونات الصوديوم	0.6	0.6	0.6
	أخلط جيداً ثم أضف .		
حامض فوسفوتنجستيك مخفف	0.6	0.6	0.6
	أخلط جيداً واترك لمدة 30 دقيقة وأقرأ اللون		
	عند 700 مللي ميكرون .		

طبق طريقة الحساب كما هو موضح في التجربة .

* الحجوم الموضحة في الجدول بالمللي لتر .

الفصل الخامس

بروتينات مصل الدم - طرق الفصل في المجال الكهربائي .

تقدير بروتينات الدم
معلومات عامة

ان أحسن طريقة لفصل وتقدير الاجزاء المتعددة للبروتينات هي بواسطة الفصل او الترحيل الكهربائي على الورق أو خلات السليلوز او الاجار (electrophoresis) ومن جهة اخرى يمكن تقدير بعض المكونات البروتينية في بلازما الدم عن طريق فصلها وتجزئتها (fractionation) بزيادة تركيز بعض الاملاح في محلول البروتينات . ولكن هناك بعض الاعتراضات على طريقة الترسيب بالملح حيث ان مدى نجاح ترسيب بروتين معين باستخدام تركيز معين من محلول ملحي تتأثر بعدة عوامل طبيعية وكذلك على ظروف التجربة مثل مقدار الحضن طول الوقت التحضين (incubation) والحرارة وطبيعة البروتينات الاخرى الموجودة ... الخ ، وعليه فمن غير الممكن الحصول على ترسيب نوعي وكامل (specific and complete) لبروتين معين او لمجموعة من البروتينات المحددة ومن جهة اخرى فان تراكيز الاملاح التي تستخدم غير ثابتة ويحدث لها بعض التغير عند حفظها لفترات طويلة مثل ترسيب كمية من الملح المذاب وخاصة عند انخفاض درجة حرارة الغرفة ولذا فان النتائج التي نحصل عليها قد تكون متباينة كما وان اجراء ترسيب البروتينات عند درجات حرارة منخفضة قد يتسبب عنها تبلور بعض الملح خلال عملية الاضافة والمزج مما يؤدي الى تغيير النسبة المئوية لتركيز المحلول .

وبالرغم من هذه الصعوبات فان استخدام طريقة التجزئة بمحلول الملح لتقدير بعض المكونات البروتينية في مصل الدم كثيراً ماتستعمل على نطاق واسع للاغراض الطبية السريرية ان كمية الالبيومين (الاح) في البلازما بهذه الطريقة تصل الى (5.3–4.2) غرام لكل (100) مللي لتر في الحالات الطبيعية عند الاصحاء وان نسبة الاح الى الكوبيولونات الكلية (total globulins)(والتي يرمز لها نسبة الاح/الجلوبيولينات) تقع في حدود (1.5) تقريباً . وتتغير هذه النسبة في عدد من الحالات المرضية التي يصاحبها تغير في نسب تكوين البروتينات سواء الاح او الجلوبيولينات .

هناك بروتين منشىء اللفين وهو من المكونات البروتينية في بلازما الدم ويوجود في الاشخاص الاعتياديين بكميات تصل الى (150–400) مللي غرام لكل (100) مللي لتر ويقدر في البلازما حيث ان المصل بعد تخثر نموذج الدم لايحتوي على هذا البروتين .

طريقة بيوريت لتقدير البروتينات

تعتمد طريقة البيوريت لتقدير البروتينات على خاصية تفاعل الاواصر الببتيديه (والتي بدورها تعبر عن تركيز البروتين في النموذج مع كبريتات النحاس القاعدية ليعطي لون بنفسجي) . ونظراً لدقة وحساسية الطريقة فانه يتم تقدير البروتينات الكلية في مصل الدم بعد تخفيفه بالماء بنسبة (15:1) في حين يتم تقدير الاح بعد ترسيب الكلوبيولينات باستخدام محلول كبريتيت الصوديوم (28%) وتصل التخفيف بعد اجراء عملية الترسيب الى (12:1) .

- يتم تقدير منشيء الليفين بعد اعادة تكلس (recalcification) البلازما باضافة كمية كلوريد الكالسيوم وتجميع الجلطة وغسلها ثم تذويبها في كاشف البايوريت .

نماذج الدم المطلوبة وطرق معاملتها :

أ - لتقدير مجموع البروتين والاح

يجمع (2-3) مللي لتر من الدم الوريدي والذي يتم سحبه بعد كرب (tourniquet) قصير وضعيف ويترك ليتخثر ويفصل المصل ، على ان يكون خالياً من أية آثار لتحلل كريات الدم الحمراء . (ويلاحظ انه يمكن استخدام بلازما الدم لتقدير البروتين الكلية ولكن يجب الأخذ في الاعتبار ان النتيجة التي تحصل عليها تزيد بحوالي (0.5) غرام في كل (100) مللي لتر نظراً لدخول منشيء الليفين في التقدير .

ب - لتقدير منشيء الليفين : ضع في انبوب منبذه مدرج (0.5) مللي لتر من محلول سترات الصوديوم تركيز (3.7%) واضف اليه نموذج الدم الى ان يصل الحجم الى (5) مللي لترات (اي ان كمية الدم المضافة تساوي (4.5 مللي لتر) اغلق واخلط جيداً .

ثم انبذ . وبعدها اقرأ الحجم الكلي لمحتويات الانبوب وكذا حجم كريات الدم (حيث ان هذه القيم تستخدم في الحسابات) وفي التقدير تستخدم الطبقة العليا والتي تمثل بلازما الدم .

طريقة تقدير البروتين الكلي والاح

اختبار مجموع البروتين :

اخلط (0.2) مللي لتر من بلازما الدم مع (2.8) مللي لتر ماء (يصبح (15:1) بالنسبة الى التركيز الاصلي في نموذج البلازما). ويمكن تجاهل ظهور اي عكارة حيث انها ستختفي عند اضافة كاشف البايوريت .

جدول (18) تقدير البروتين الكلي في مصل الدم أو البلازما .

المحلول*	النموذج	الكفيء	القياس
المصل أو البلازما	0.2	—	—
ماء مقطر	2.8	3.0	—
البروتين القياسي	—	—	3.0
كاشف بيوريت	5.0	5.0	5.0
	أخلط جيداً وضع حمام مائي عند 37م لمدة عشرة		
	دقائق وأقرأ اللون 540 مللي ميكرون .		

طبق طريقة الحساب كما هو موضح في التجربة .

* الحجوم الموضحة في الجدول بالمللي لتر .

اختبار الاح :

أضف (0.5) مللي لتر من البلازما الى (5.5) مللي لتر من محلول كبرتيات الصوديوم تركيز (28%) (يصبح التخفيف (12:1) بالنسبة لتركيز الاح في نموذج البلازما) في انبوب منبذة حجم (10) مللي لتر وأخلط بقلب الانبوب (mix by inversion) اضف (1) مللي لتر من كاشف (span–ether) يمكن استخدام الايثر المعملي لهذا الغرض واغلق الانبوب جيداً واقلبه رأساً على عقب برفق حوالي (20) مرة وبعد ثبات الانبوب لبضع دقائق لينخفض الضغط جيداً داخل الانبوبة) ارفع السدادة وانبذه لمدة عشرة دقائق عند (3000) لفة في الدقيقة . ان اضافة (span–ether) يساعد على فصل الكلوبيولينات المترسبة على شكل قرص عند السطح بين طبقة الماء والايثر . بينما استعمال الانبوب حجم (10) مللي لتر يحدد حيز الهواء وبالتالي يقلل من احتمال تغير طبيعة البروتينات عند السطح البيني سائل – هواء (air liquid inter–face) ادخل ماصة ذات بصلة (bulb–pipette) بمحاذات جانب الانبوب زائحاً بطرف الماصة وبرفق قرص الكلوبيولينات المترسبة ، واسحب (3) مللي لتر من الطبقة المائية السفلى التي توجد تحت القرص . لاحظ ان تركيز الاح في هذا المحلول يبلغ (1/12) من التركيز الاصلي في نموذج البلازما .

انبوب البروتين القياسي : اضف (3) مللي لتر من محلول القياسي (0.5) غرام لكل (100) مللي لتر .

انبوب الكفيء : اضف (3) مللي لتر من الماء المقطر . اضف (5) مللي لتر من كاشف البايوريت لكل انبوب واخلط جيداً وضع في حمام مائي بدرجة (37C°) لمدة عشرة دقائق بالضبط . ثم برد وأقرأ اللون البنفسجي الناتج عند الموجة الضوئية (540 مللي ميكرون) او مستخدماً (Ilford green filter No625).

جدول (19) تقدير الأح في مصل أو البلازما .

المحلول*	النموذج	الكفيء	القياس
المصل أو البلازما	0.5	—	—
كبريتات الصوديوم 28%	5.5		
	أمزج جيداً وأترك لمدة 5 دقائق ثم أضف		
أيثر	1	—	—
	أمزج الانبوب بلطف وأترك لمدة 5 دقائق ثم ضع في جهاز الطرد المركزي لمدة 10 دقائق عند 3000 لفة/الدقيقة ثم أنقل 3 مللي لتر من المحلول السفلي الى انبوب جاف .		
المحلول السفلي الرائق	3	—	—
ماء مقطر	—	3	—
بروتين قياسي	—	—	3
كاشف بيوريت	5	5	5
	أخلط جيداً وضع في حمام مائي عند 37°م لمدة 10 دقائق وأقرأ اللون عند 540 مللي ميكرون .		

طبق طريقة الحساب الموضحة في التجربة .

* الحجوم الموضحة في الجدول بالمللي لتر .

الحساب :

$$\text{مجموع بروتين البلازما} = \frac{\text{ن} - \text{ب}}{\text{س} - \text{ب}} \times (0.5) \times (15)$$

$$= \frac{\text{ن} - \text{ب}}{\text{س} - \text{ب}} \times (7.5) = \text{غرام لكل (100) مللي لتر بلازما}$$

$$\text{اح البلازما} = \frac{\text{ن} - \text{ب}}{\text{س} - \text{ب}} \times (12 \times 0.5)$$

$$= \frac{\text{ن} - \text{ب}}{\text{س} - \text{ب}} \times (6) = \text{غرام/100 مللي لتر بلازما}$$

حيث ان ن = الكثافة الضوئية للنموذج .
س = الكثافة الضوئية للمحلول القياسي .
ب = الكثافة الضوئية للمحلول الكفىء .

طريقة تقدير منشىء الليفين

أضف (2) مللي لتر من بلازما الدم الى (50) مللي لتر من محلول كلوريد الصوديوم الفسيولوجي (تركيز 0.9%) في دورق ثم أضف (2) مللي لتر من محلول كلوريد الكالسيوم تركيز (2.5%) اخلط واحفظ عند درجة (37ْ) لمدة ساعتين . أجمع الجلطة بالتقليب البطيء بواسطة قضيب زجاجي رفيع واضغط اياها على جانب الدورق لازالة السائل الزائد منها . اغسل الجلطة بكمية قليلة من محلول ملح الصوديوم الفسيولوجي ثم حولها الى انبوب آخر جاف ونظيف . ذوب الليفين بأضافة (5) مللي لتر من كاشف البايوريت وسخن عند درجة ، (37ْ)م ثم أضف (3) مللي لتر من الماء المقطر وأقرأ الكثافة الضوئية للون الناتج عند الموجة (540 mu) او بمرشح (ilford–green) الاخضر الفاتح رقم (625) وفي نفس الوقت أقرأ الكثافة الضوئية لانبوب المحلول القياسي واخر للكفىء محضرين كما سبق الوصف .

الحساب :

يحتوي الانبوب القياسي على (15) مللي غرام من بروتين ولذا فأن كمية منشيء الليفين في (2) مللي لتر بلازما المستخدمة هي :

$$= \frac{ن - ب}{س - ب} \times (15) \text{ مللي غرام}$$

ومنشأ الليفين في (100) مللي لتر من البلازما المستخدمة =

$$= \frac{ن - ب}{س - ب} \times (15) \times \left(\frac{100}{2}\right) = \text{مللي غرام/(100) مللي لتر}$$

$$= \frac{ن - ب}{س - ب} \times (750) = \text{مللي غرام/ (100) مللي لتر}$$

التصحيح للتخفيف ولحجم البلازما

$$\frac{\text{مللي غرام٪ منشىء الليفين} \times (\text{الحجم الكلي} - \text{حجم كريات الدم})}{\text{الحجم الكلي} - \text{حجم كريات الدم} - (0.5)}$$

= مللي غرام منشيء الليفين لكل (100) مللي لتر بلازما .

جدول (20) تقدير منشىء الليفين في بلازما الدم .

المحلول*	النموذج	الكفىء	القياس
البلازما	2		
كلوريد الصوديوم	50		
كلوريد الكالسيوم	2		
	أمزج جيداً وأترك لمدة ساعتين عند 37ْم ثم أجمع الجلطة بالتقليب البطيء وأخرجها وأغسلها/بكلوريد الصوديوم الفسيولوجي وضعها في انبوب .		
الجلطة المتكونة	الجلطة		
كاشف بيوريت	5	5	5
	سخن عند 37ْم حتى تذوب الجلطة ثم برد وأضف .		
ماء مقطر	3	3	—
بروتين قياسي	—	—	3
	أمزج جيداً وأقرأ اللون عند 540 مللي ميكرون .		

طبق الحساب كما موضح في التجربة

* الحجوم الموضحة في الجدول بالمللي لتر

القيم الاعتيادية :

تركيز مجموع البروتين الكلي : (6.5 – 7.9) غرام لكل (100) مللي لتر من مصل الدم .
تركيز أح مصل الدم = (4.2 – 5.5) غرام لكل (100) مللي لتر من مصل الدم .
تركيز منشىء الليفين = (150 – 450) مللي غرام لكل (100) مللي لتر من بلازما الدم .

المحاليل :
كاشف البايوريت :

اذب (9) غرام من ملح الصوديوم بوتاسيوم طرطرات في (500) مللي لتر من محلول هيدروكسيد الصوديوم (0.2) عياري . أضف (3) غرام من كبريتات النحاس المائية ($CuSO_4 . 5H_2O$) .

واذب بالتحريك وعند تمام الذوبان اضف (5) غرام من ايوديد البوتاسيوم وأكمل الحجم الى اللتر مستخدماً محلول هيدروكسيد الصوديوم (0.2) عياري .

محلول البروتين القياسي : (تركيز 0.5 غرام/(100) مللي لتر) يجب حفظ هذا المحلول مجمداً بدرجة (-15c°) او اقل وبحجوم صغيرة يتم أخذ كمية صغيرة واحدة وتسييحها مع الخلط الجيد كلما دعت الضرورة لاستخدامها في اجراء التقدير ولمرة واحدة اي لايعاد تجميدها مرة اخرى وبهذا يمكن تجنب تجميد تسيح البروتين المخزون عدة مرات حيث ان ذلك يؤثر على طبيعة البروتين ومن ثم على تفاعله مع كبريتات النحاس القلوية .
ويمكن تحضير المحلول القياسي بطرق مختلفة منها :-

أ – اذب (0.5) غرام من الاح البقري المتبلور الجاف (dry crystalline bovine albumin) في قليل من الماء واكمل الى حجم (100) مللي لتر بالماء المقطر ولقد وجد ان هذا النوع من البروتين يحتوي على (99%) من وزنه مادة بروتينية بعد تجفيفه في مجفف تحت هواء مخلخل وفوق حامض الكبريتيك المركز . مع تقدير محتواه من البروتين باستعمال طريقة كلداهل (kjeldahl) للتعيين .

ب – قدر بطريقة كلداهل الدقيقة محتوى البروتين لنموذج من خليط امصال مختلفة ، ثم خفف نموذج المصل بمحلول كلوريد الصوديوم الفسيولوجي ووزع النموذج بحجوم صغيرة في عدد من الانابيب وأحفظه عند درجة – (9 – 15°م) .

جـ – مستخدماً طريقة بيوريت قدر المحتوى البروتين لخليط من الامصال وكذا لمحلول بروتين قياسي معلوم نسبة النتروجين البروتيني به واحسب تركيز البروتين في خليط الامصال ثم جزء الخليط بحجوم صغيرة في انابيب صغيرة واحفظه عند درجة – c– 15°م .

د - اعمل محاليل ملائمة لمصل سيطرة تجاري في محلول كلوريـد الصوديوم الفسيولوجي وجزء المحلول في انابيب واحفظه عند درجة - (-15 c)م° .

محلول كبريتات الصوديوم (28%) :

اذب (140) غرام من كبريتـات الصوديوم اللامـائيـة في (500) مللي لتر من المـاء المقطر عنـد درجة (40c)م وأحفظ المحلول في حمام مائي بدرجة (37)م لمنع التبلور .

كاشف (span-ether) :

خض (1) مللي لتر من (span-20) (sorbitol mono-oleate) مـع (90) مللي لتر من الايثر ورشح واكمل الى (100) مللي لتر بالايثر ، وخزن بثلاجة عند درجة (4)م .

محلول كلوريد الصوديوم (0.9%) :

(9) غرامات من ملح كلوريد الصوديوم النقي لكل لتر من الماء المقطر .

محلول كلوريد الكالسيوم تركيز (2.5%):

اذب (2.5) غرام من كلـوريـد الكالسيـوم النقي في كميـة من المـاء المقطر ثم يكمـل الى الحجم (100) مللي لتر بالماء المقطر .

فصل البروتينات بالمجرة الكهربائية (elecophoresis of proteins)

ان الجزيئات المحملة بشحنات كهربائية تهاجر في المجال الكهربائي كل الى القطب المعاكس لها في الشحنة وهذا هو اساس فصل المركبات مثل البروتينات في المجال الكهربائي .
وتتوقف هجرة البروتينات على عدة عوامل اهمها :-

1 - نوع الشحنة الكهربائية على جزيء البروتين فالجزيئات المحملة بشحنات معاكسة ستهاجر في اتجاهات مختلفة :
2 - كية الشحنة الكهربائية فالجزيئات تهاجر مسافات مختلفة اذا كانت شحناتها متباينة وكلما زادت الشحنة كلما زادت السرعة الى القطب المعاكس .
3 - الوسط الداعم (supporting medium) اذا كان من الورق (filter paper) او خلات السيلولوز (cellulose acetate) ، الاجار - جل (agar-gel) ، او النشا (starch-gel) ، راتنج مثل (sephadex resin) .
4 - حجم جزيء البروتين ومسامية (porosity) الوسط الداعم .
5 - اثرها للمحلول الدارىء المستخدم حيث تتوقف عليها الشحنة على جزيء البروتين .
6 - درجة الحرارة - فتزداد السرعة كلما ارتفعت الحرارة من (20-40)م بسبب تبخر المحلول من الوسط الداعم ثم تتوقف الهجرة عند درجات الحرارة العالية لتغير طبيعة البروتينات (denaturation) وتخثرها (coagulation) .

ومن أهم تطبيقات الفصل بالمجرة الكهربائية هو دراسة التغيرات في تركيز بروتينات مصل الدم حيث يتم فصلها باستخدام الفصل على الورق الى خمسة مكونات رئيسية هي الالبيومين - الفا 1 - جلوبيولين - الفا 2 - جلوبيولين بيتاجلوبيولين - جاما - جلوبيولين ، حيث ان وجود انخفاض او زيادة في واحد او اكثر من هذه البروتينات قد يساعد على تشخيص حالة مرضية معينة . ينخفض مستوى الالبيومين في مصل الدم في حالة انخفاض كفاءة الكبد في تكوين هذا البروتين ، في حالة فقدان الالبيومين في البول نتيجة خلل في الكلية ، وفي حالة نقص البروتين الغذائي . تزداد البروتينات من نوع الجاما جلوبيولين (التي تحمل الاجسام المضادة (antibodies) في حالة اصابة الانسان بأحد الامراض المعدية (infectous disease) .

اساس الطريقة :

يتم فصل البروتينات على الوسط الداعم ثم تسخن عند درجة (120) (عند الفصل على الورق لتثبيتها في اماكنها (for the fixation of separated proteins) او تعامل بحامض الخليك (10%) (لتثبيتها في اماكنها عند الفصل على خلات السليولوز او الاجار او النشا) . ثم

تعامل بمحلول الصبغة حيث تتحد معها ثم تغسل الصبغة الزائدة حتى تصبح البروتينات كأشرطة محملة بالصبغة على خلفية (background) شفافه (transparent) عديم اللون تقريباً . ثم تقطع اشرطة البروتين المحملة بالصبغة ويتم استخلاص الصبغة من كل جزء وتقديرها بقياس تركيز لونها وتستخدم القراءات في حساب تركيز كل بروتين على حدة كجزء من البروتين الكلي . او يتم وضع الشريط في جهاز يسجل قيم كل بروتين) (والتي تقابل تركيز البروتين) والتي منها يمكن حساب تركيز كل بروتين وكما هو موضح في الاشكال التالية .

طريقة العمل :

أ - على ورق الترشيح (on filter paper)

1 - بلل الورق بالمحلول الدارىء برفق وارفع الزائد من المحلول بورقة ترشيح .
2 - ضع نموذج المصل في منتصف الورقة .
3 - شغل الجهاز لمدة 16 ساعة مستخدماً (120) فولت .
4 - ارفع الورقة وجففها في فرن كهربائي عند (110-120)م .
5 - اصبغ البروتينات بوضع الورقة في محلول (10B) (amido-black) لمدة عشرة دقائق .
6 - اغسل الزائد من الصبغة باستخدام محلول حامض الخليك تركيز (5%) حتى تصبح خلفية ورقة الترشيح عديمة اللون تقريباً .
7 - جفف الورقة مرة اخرى بالفرن الكهربائي .
8 - قطع اجزاء الورقة المحملة بالبروتينات واستخلص الصبغة من كل جزء في انبوبة اختبار مستخدماً (5) مللي لتر من هيدروكسيد الصوديوم تركيز (0.5) عياري مع الرج من وقت لاخر ثم أقرأ اللون عند الموجة الضوئية طول (650) مللي ميكرون .

ب - على خلات السليولوز :

مثل طريقة العمل على ورق الترشيح ولكن الوقت اللازم للفصل من (90-60 minutes) دقيقة . وتثبت البروتينات بحامض ثلاثي كلوريد الخليك والصبغة المفضلة هي (ponceau S) وهذه الطريقة شائعة الاستعمال لصغر نموذج المصل المطلوب لاجراء الفصل .

جـ - على الاجار - جل

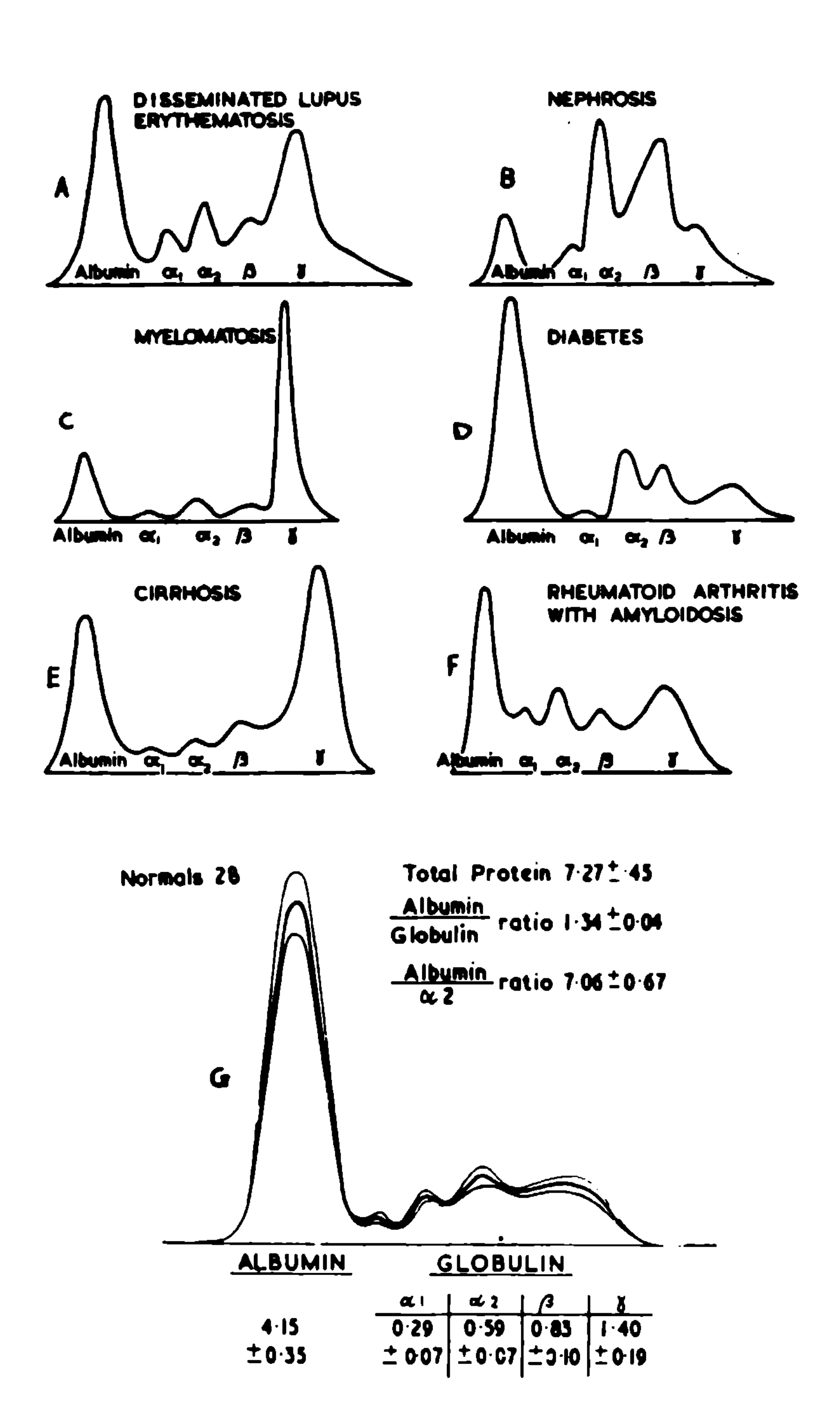
يتم اجراء فصل البروتينات على الآجار - جل على سلايدات الميكروسكوب الزجاجية (microscopic glass slide) يوضع على السلايد (2.5-3.0) مللي لتر من محلول الآجار وهو ساخن (عند 90cم) ثم يترك ليبرد وينجمد {تستغرق هذه العملية حوالي (15-20) دقيقة}

ثم يعمل ثقب مستدير او شق طولي في ثلث طول السلايد حيث توضع فيه كية (10)ميكروليتر من النموذج ويترك ليتشرب مع الاجار لمدة لاتزيد على (5) دقائق . ثم يمرر التيار الكهربائي عند (150) فولت ولمدة (60-90) دقيقة (ويمكن وضع صبغة (bromophenol blue) مع البروتين لمعرفة سرعة هجرة البروتينات اثناء اجراء عملية الفصل) . وبعد اتمام عملية الفصل يغمس السلايد في محلول حامض الخليك لمدة (5) دقائق لترسيب البروتينات وبعدها يوضع السلايد في صبغة (amido-black 10 B)لمدة (10-15) دقيقة لصبغ البروتينات بعدها يغسل السلايد جيداً بمحلول الخليك (5%) حتى تصبح خلفية السلايد شفافة . بعدها تفصل المنطقة التي يشغلها كل بروتين على حدة في انبوبة اختبار ويستخلص اللون في (2-3) مللي لتر من (N/50) هيدروكسيد الصوديوم ثم يقرأ اللون في جهاز قياس تركيز الالوان ويحسب تركيز كل بروتين بالنسبة للبروتينات الكلية بنموذج المصل .

ويمكن في حالة الفصل على ورق الترشيح او خلات السليولوز او الاجار - جل رسم مخطط يبين قيم البروتينات ومنها يحسب تركيز كل على حدة وذلك بواسطة جهاز يعرف بـ (scanner) .

ويبين الجدول الآتي التغيرات في بروتينات المصل في عدد من الحالات عند الانسان :

الحالة	الالبيومين	جلوبيولين الفا 1	الفا 2 جلوبيولين	بيتاجلوبيولين	جاما - جلوبيولين
الحمل	—	———	+	+	−
في الطفولة(infancy)	—	———	+	+	+
(myeloma)	—	———	——	+	++
التهاب الكلية	———	———	+ +	+	−
عدم وجود الجاماجلوبيولين					——
الوراثي					——
(amyloid)	−	———	+ +	———	————
(lupus eryth) matosis	−		+ +		+
مرض السكر	−		+	+	
التهاب المفاصل الروماتزمي	−		+	+	
تشمع الكبد	——				+ +
انيرقان الانسدادي			·	+	


DISSEMINATED LUPUS ERYTHEMATOSIS
A
Albumin α1 α2 β γ
NEPHROSIS
B
Albumin α1 α2 β γ
MYELOMATOSIS
C
Albumin α1 α2 β γ
DIABETES
D
Albumin α1 α2 β γ
CIRRHOSIS
E
Albumin α1 α2 β γ
RHEUMATOID ARTHRITIS WITH AMYLOIDOSIS
F
Albumin α1 α2 β γ
Normals 28
Total Protein 7·27 ± ·45
Albumin / Globulin ratio 1·34 ± 0·04
Albumin / α2 ratio 7·06 ± 0·67
G
ALBUMIN
GLOBULIN
α1
α2
β
γ
4·15
± 0·35
0·29
± 0·07
0·59
± 0·07
0·83
± 0·10
1·40
± 0·19

Electophoretic patterns for serum proteins in :

A) Disseminetaed Lupus erythematosis

B) Nephrosis.

S) Myelomatosis

D) Diabetes.

E) Cirrhosis.

F) Rheumatoid arthritis With amyloidosis.

G) Normals.

N.B: Patterns are scanned after filter paper electrophoresis.

المحاليل

المحلول المنظم : (أس ها 8.6)

تـذاب (12.76) غرام من ثنـائي اثيـل بربيتيـورات الصـوديـوم مـع (1.66) غرام من حامض ثنائي اثيل البربيتيورات في حجم من الماء ويكمل حتى اللتر .

محلول الصبغة :

أ - (1) غرام من (amido–black 10 B) (100) مللي لتر من محلـول (5%) حـامض الخليك .

ب - (1) غرام من (Ponceau S) مع (3) غرام من حـامض ثلاثي كلـور الخليـك (100) مللي لتر من الماء .

محلول الغسيل :

أ - (5%) حامض الخليك .

ب - (9) حجوم من كحول الميثيل وحجم من حـامض الخليـك الثلجي . ولأجراء عمليـة الـ (scanning) تستخدم :-

أ - مزيـج من (33) مللي لتر من زيـت البرافين (paraffin) ، (16) مللي لتر من مـادة (ά–bromonaphthalene) ، (20) مللي لتر زيلين (xylene) (1) مللي لتر من مـادة (sorbitol–mono–oleate) لجعـل اوراق الترشيـح شفـافـة صـالحـة لاجراء المخطط .

ب - تستخدم مادة (Decahydronaphthalene) لجعل شريط خلات السليولوز شفافاً صالحاً لاجراء المخطط .

الفصل السادس

الفصل الكروماتوجرافي (للاحماض الامينية) ، (للسكريات) .

الفصل الكروماتوجرافي (chromatography)

يمكن تعريف الكروماتوجرافي بأنه فصل مكونات خليط من خلال الفروقات بين ذوبان وامتزاز هذه المكونات كل حن الآخر في أحد المذيبات او على الوسط الداعم على التوالي .

وهناك عدة انواع من الكروماتوجرافي وهي :

أ - كروماتوجرافي الامتزاز (Adsorption chromatography)

وهنا يتم الفصل بامتزاز المكونات على وسط داعم صلب مع تحركها على هذا الوسط بذوبانها في وسط سائل متحرك (flow–mobile liquid) .

ب - كروماتوجرافي توزيعي (Partition chromatography)

وهنا يتم فصل المكونات بتوزيعها حسب درجة ذوبانها بين الماء او سائل عضوي غير متطاير (non–volatile organic liquid) ويسمى الوسط الثابت (stationary phase) وبين وسط آخر متحرك قد يكون سائل او غاز ، وفي الحالة الاخيرة يسمى (gas–liquid chromatography) الكروماتوجرافي - الغازي - السائل . ويمكن تطبيق الكروماتوجرافي التوزيعي على الورق (paper partition chromatography) او على طبقة رقيقة من مادة صلبة تكسو لوح من الزجاج ويسمى (thin layer chromatography) واذا ما كانت احدى مكونات الخليط مرتفعة الذوبان في الوسط المتحرك (mobile phase) فانها تنتقل اسرع من غيرها والعكس صحيح وتسمى عملية فصل المكونات تحت تأثير تحرك المذيبات والسوائل او الغازات بانماء الكروماتوجرافي (development of the chromatogram)وقد يكون تحرك هذه المذيبات مع الجاذبية الارضية ويطلق عليه (descending chromatography) او عكسها ويطلق عليها (ascending chromatography) وبعد عملية الانماء «في حالة استخدام الكروماتوجرافي الورقي» توضع علامة عند مقدمة (front) السائل على الورق كما يعلم مكان كل مكون من الخليط وكذلك مكان بداية وضع الخليط (starting point or origin) وتسمى النسبة بين ،

$$(Rf) = \frac{\text{المسافة من نقطة البدء الى مقدمة مكان المكون}}{\text{المسافة من نقطة البدء الى مقدمة السائل}}$$

وتتوقف Rf على عدة عوامل منها (1) اختلاف تكوين السائل النامي (development solvent) ، (2) نوع الوسط الداعم (3) تركيز المكونات (4) حجم غرفة الكرماتوجرافي (5) (chromatography chamber) 5 - الرطوبة (humidity) (6) الحرارة

(7) أس ها . ولذا نفضل استخدام نقطة تحتوي على المكونات التي يراد تعيينها في نموذج تحت الفحص لتخدم كمرجع لتحديد مكان هذه المكونات في النماذج المجهولة وتوضح الاشكال الآتية خطوات الانماء الكروماتوجرافي .

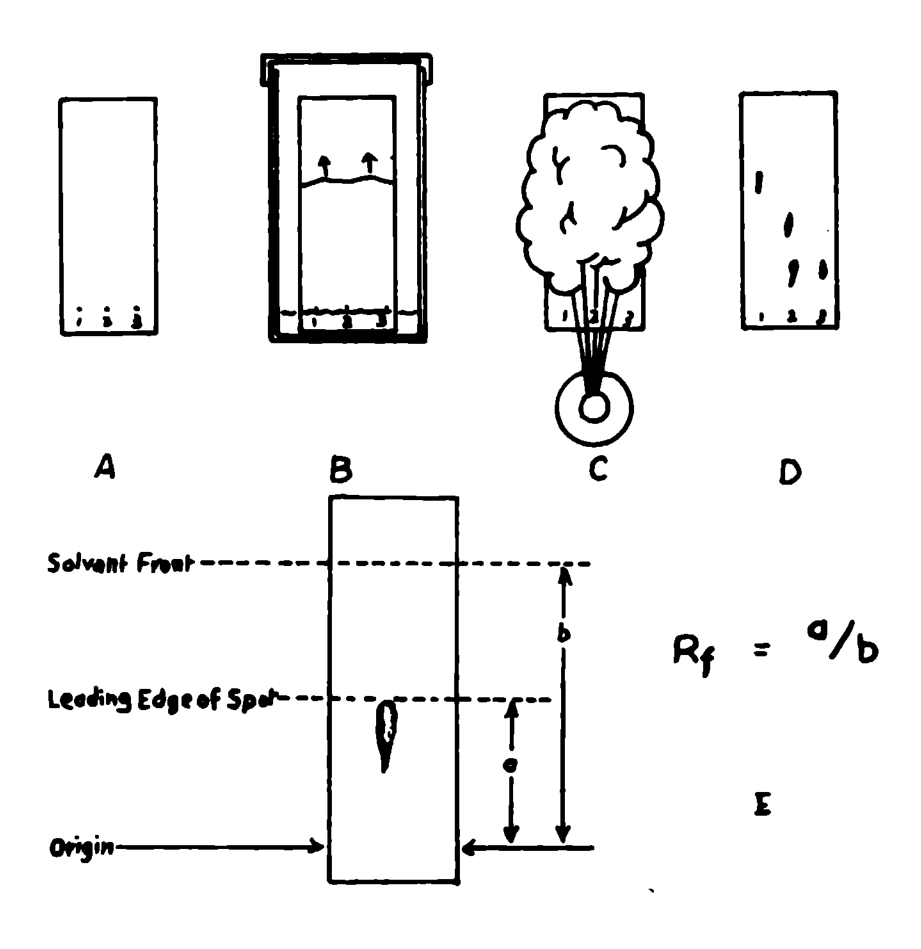
A) ورقة الترشيح او لوح الزجاج المغطى بالوسط الداعم وعليه ثلاث نقاط تحت الفحص (1,2,3)

B) انماء الكروماتوجرام بالطريقة الصاعدة

C) رشي الكروماتوجرام لأظهار مكان مكونات تحت الفحص .

D) الكروماتوجرام مبيناً عليه موقع المكونات بعد فصلها .

E) طريقة حساب قيمة (Rf) للمكون الذي تم فصله بالكروماتوجرافي .



الفصل الكروماتوجرافي للاحماض الامينية

يمكن استعمال الكروماتوجرافي في فصل الاحماض الامينية من مصل الدم وفيما يلي طريقة العمل :

ترسيب البروتينات من مصل الدم بأضافة (1) مللي لتر من مصل الدم الى (10) مللي لتر من كحول الايثيل تركيز (95%) وتمزج جيداً وتترك لمدة (10) دقائق . ثم تدار في جهاز الطرد المركزي عند (3000) لفة في الدقيقة لمدة (10) دقائق . ويؤخذ المحلول الرائق العلوي بالكامل ويبخر عند درجة (80–70°C)م على حمام مائي ويفضل تحت ضغط منخفض الى ان يجف تماماً تقريباً . يذاب الباقي في (0.1–0.2) مللي لتر من محلول الفوسفات المنظم (أس ها 8.6) ويضغط الحجم عند (0.3–0.4) مللي لتر بالمحلول المنظم . ثم توضع نقطة (0.1–0.2) من المستخلص على ورقة الترشيح مع عدم جعل الدائرة كبيراً وذلك بتوجيه تيار من الهواء الساخن اثناء وضعها (درجة حرارة الهواء لاتزيد عن (60°)م حتى لاتتكسر بعض الاحماض الامينية) ينمى الكروماتوجرام مستخدماً مزيج من كحول البيوتيل وحامض الخليك والماء ولمدة تقرب من (16) ساعة بطريقة الصعود . ثم يجفف الكروماتوجرام في الهواء ويرش بمحلول النينهيدرين ويوضع في فرن عند (110)م لمدة (15) دقائق حيث يتم التفاعل بين الاحماض الامينية ومادة النينهيدرين لينتج مركبات زرقاء – بنفسجية – ارجوانية اللون في اماكن وجود الاحماض الامينية المختلفة يمكن التقدير الكمي لكل حامض اميني على حدة باستخلاص اللون الخاص به (2–3) مللي لتر من كحول البيوتانول وقراءة كثافته الضوئية ومقارنته بلون محلول قياسي لنفس الحامض الاميني .

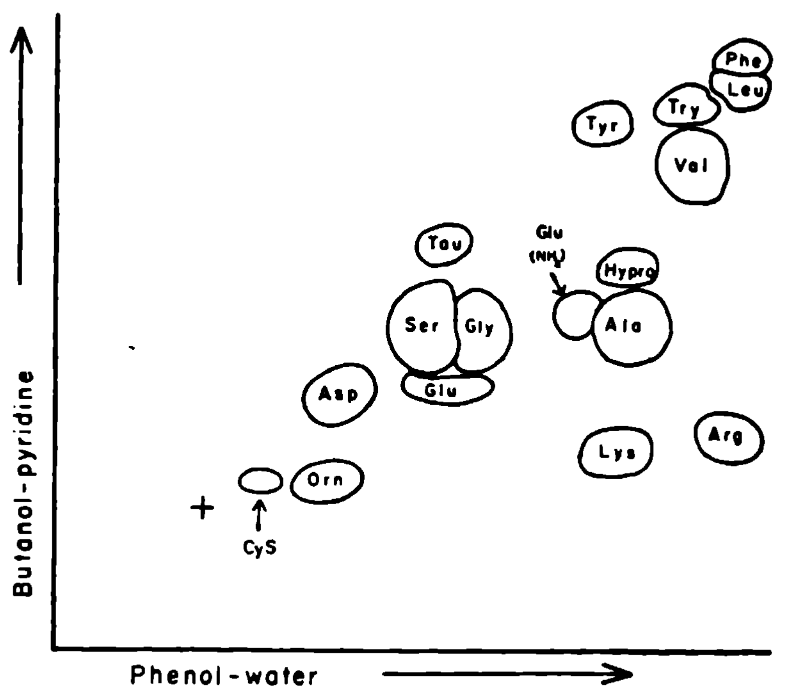
المحاليل :

1 – مزيج من كحول البيوتانول وحامض الخليك والماء بنسبة 4 :2 :1

2 – محلول الرش (ninhydrine) باذابة (0.1) غرام مادة النينهيدرين (triketohydrandene hydrate) في (100) مللي لتر من كحول البيوتانول (n–butanol) .

في حالات كثيرة عند وجود عدد كبير من الاحماض الامينة في النموذج تحت الفحص يفضل اجراء الكروماتوجرافي ثنائي الاتجاه (two–dimensional chromatog–ram) حيث يتم انماء الكروماتوجرام بسائل الاتجاه الاول ثم يجفف الكروماتوجرام ويتم اعادة الانماء بسائل آخر في :

اتجاه عمودي على الاتجاه الاول وكما هو مبين في الشكل .



. (two dimensional chromatogram for amino acids mixture)

وفي هذه الحالة يكون وضع نقطة النموذج في طرف ورقة الترشيح كما هو موضح بالرسم .

المحاليل :

1 - مذيب بيوتانول - بيريدين : أمزج (60) حجم من البيوتانول (60) حجم من البيريدين مع (60) حجم من الماء ، ويستخدم هذا المحلول لعمليتين انماء متتاليتين (محلول الاتجاه الاول) .

2 - مذيب الفينول - ماء : يحضر باضافة (125) غرام من الماء الى (500) غرام من الفينول ثم ويوضع في زجاجة بنية اللون ويترك المحلول خلال الليل ليصبح متجانس ويمكن استخدام هذا المحلول لعمليتين انماء متتاليتين (محلول الاتجاه التالي) .

3 - محلول النينهيدرين : كما هو اعلاه .

الفصل الكرماتوجرافي للسكريات

كما يمكن تطبيق طريقة الفصل الكرماتوجرافي لدارسة وفصل مكونات خليط من السكريات ، ان السكريات المختزلة التي قد توجد في البول هي الجلوكوز ، الفركتوز ،

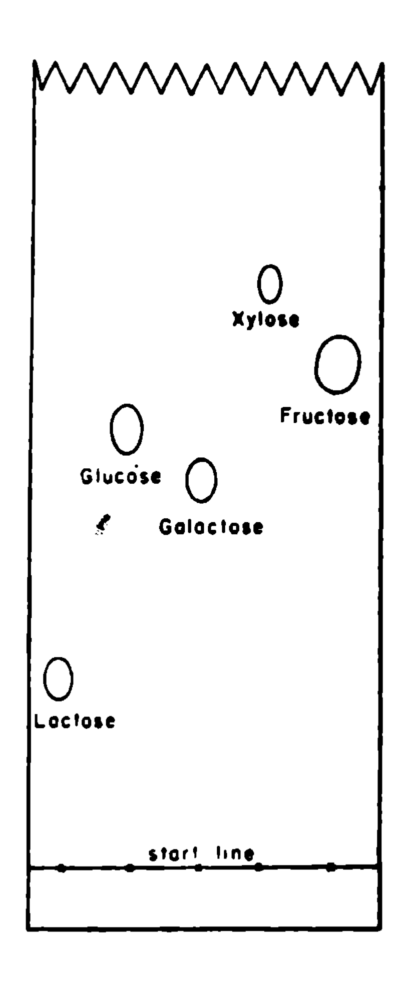
الجالاكتوز ، الريبوز ، زيليلوز (xylulose) كما قد يوجد بجانب ذلك سكر السكروز . ومن الضروري التميزوتحديد انواع السكريات التي توجد في البول عندما يمتلك الاخير خاصية الاختزال للمحاليل التي تستخدم عن الكشف عن وجود السكريات المختزلة كيفياً . ففي الايام الاخيرة من الحمل يظهر البول قدرة اختزالية عالية ويجب تحديد ما اذا كان ذلك يعود الى وجود الجلوكوز او اللاكتوز ام كلاهما معاً . كما يجب الكشف عن وجود الجالاكتوز في البول في الحالات الوراثية التي يكون عندها نقص في الانزيم الذي يحول هذا السكر الى الجلوكوز ومن ثم يرتفع مستواه في الدم والبول وفي بعض الحالات قد يظهر الفركتوز في البول لحالة وراثية او في حالة مرض (Wilson) وكذلك في بعض امراض الكبد . كما قد يظهر السكر الخماس (L- - xylulose) في البول في حالات وراثية (في غالبية الحالات يقتصر حدوث هذه الظاهرة بين اليهود) .

طريقة فصل السكريات :

تستخدم شريط من ورق الترشيح بطول (50)سم وعرض (17) سم وعلى مسافة تقرب من (10)سم توضع النقاط من البول ، محاليل السكر القياسية مع تجفيف النقاط باستخدام تيار من الهواء . ثم يجري انماء الكروماتوجرام بطريقة النزول (descending) مستخدماً مذيب بيوتانول - بيريدين ماء ويترك الانماء لفترة (36) ساعة ثم تجفف الورقة في الهواء وترش بمحلول (aniline-diphenylamine) وتسخن الورقة بعد رشها في فرن كهربائي عند (100-95C°)م لبضع دقائق فتظهر السكريات كبقع (spots) ملونة : يعطي الجلوكوز والجالاكتوز بقع خضراء رمادية (grey-green) ، واللاكتوز يعطي بقعة زرقاء رمادية (grey–blue) والفركتوز والسكروز يعطيان بقع بنية ويعطي ريبوز والزيليلوز بقع بنية رمادية (grey–brown) ويمثل الشكل على اليسار موقع السكريات على الكروماتوجرام بعد فصلها .

المحاليل :

المذيب : اخلط (60) حجم من البيوتانول ، (40) حجم من البيريدين ، (30) حجم من الماء ويحضر هذا المذيب طازجاً كلما كان ذلك مطلوب .



(chromatogram for a mixture of sugars after separation in an ascending chromatogram)

محلـول الرش : اذب (1) مللي لتر من الانيلين ، (1) غرام من ثنـــائي فينيـل أمين (diphenylamine) في (100) مللي لتر من الاسيتون ، أضف (10) حجوم من هـذا المحلـول الى (1) حجم من حامض الفوسفوريك تركيز (85%) .

محلول السكر المرجع : (1) غرام في (100) مللي لتر من الماء .

الفصل السابع

الانزيمات (الفوسفاتيز القاعدي - الفوسفاتيز الحامض - الاميليز - الليبيز - الكولين استريز - الترانسأمينيز) .

الفوسفاتيز القاعدي (Alkaline phosphatase)

معلومات عامة :

ان القسم الاكبر من الفوسفاتيز القاعدي في مصل الدم يأتي من النسيج العظمي والكبد ، ويتم افرازه (excretion) في الدورة الدموية من هذين النسيجين ولذا فأن ارتفاع نشاط هذا الانزيم في الحالات المرضية غالباً مايرجع الى مرض احدى هذين العضوين . كما يلاحظ ارتفاع كبير في الانزيم بمصل الدم في حالات اليرقان الانسدادي (obstructive jaundice) .

ان تقدير فعالية انزيم معين تختلف عن طرق التحليل الاخرى التي تتبع عند تقدير المحتويات البيولوجية الاخرى . وذلك لانها تتضمن قياسات سرعة التفاعل وليس تقدير كمية الانزيم بذاتها . وعليه يجب السيطرة بدقة على العوامل التي تؤثر على سرعة التفاعل مثل درجة الحرارة والوقت التي يسمح فيه للانزيم بأداء نشاطه فيه وكذلك وجود المنشطات او المثبطات ولأن الانزيمات هي بروتينات لذا يجب حمايتها من التغيرات التي قد تؤثر على طبيعتها ومن ثم فيجب حماية نماذج المصل من الحرارة والتغير في أ س ها وتجنب التجميد والتسييح المتكررين حيث ان ذلك قد يؤثر على طبيعة التركيب الشكلي لبروتين الانزيم وبالتالي يؤثر على نشاطه وفعاليته البيولوجية .

الطريقة :

الفوسفاتيز القاعدي هو الانزيم الذي يحرر مجموعة الفوسفات غير العضوية من كثير من الاسترات العضوية احادية الفوسفات وبنشاط اوفق عند أ س ها 9–10 .

ان المادة الاساس او الحليلة (substrate) الكثيرة الاستخدام لتقدير نشاط هذا الانزيم هي ثنائي صوديوم فوسفات الفينول (disodium phenyl phosphate) وتحت تأثير فعالية الانزيم يتحرر الفينول بواسطة التحلل المائي الانزيمي (enzymatic hydrolysis) وتحت ظروف محددة بالنسبة للوقت والحرارة – و أ س ها والفينول المتحرر يعطي لون بني محمر مع مادة 4– امينوانتيپيرين (4–amino–antipyrine) في وجود سيانيد حديديك البوتاسيوم وفي وسط قلوي وان شدة اللون الناتج يؤخذ كمقياس لفعالية الفوسفاتيز القاعدي ويتم تقديرها بجهاز قياس الالوان بالمقارنة مع اللون المماثل والناتج من محلول قياس للفينول .

نموذج الدم :

تجمع 2 مللي لتر من الدم الوريدي ويترك للتجلط . أنبذ وأفصل المصل من الجلطة ولاحظ ضرورة عدم وجود اية اثار لتحلل كريات الدم الحمراء (haemolysis of RBC) .

خطوات العمل :

نموذج الفحص (Test): اخلط في انابيب اختبار (فحص مزدوج) (1.0) مللي لتر من المحلول الدارىء (buffer solution) . (1.0) مللي لتر من محلول مادة الاساس (ثنائي صوديوم فوسفات الفينول) وضع في حمام مائي عند درجة 37 م لمدة ثلاثة دقائق .

ثم اضف مستعملا ساعة توقيت .

(0.1) مللي لتر مصل الدم واخلط بهدوء وحضن كل انبوب (15) دقيقة بالضبط ثم اوقف التفاعل باضافة (0.8) مللي لتر من محلول هيدروكسيد الصوديوم (0.5 عياري) .

نموذج السيطرة (control) : اخلط في انابيب اختبار (فحص مزدوج) (1.0) مللي لتر من المحلول الدارىء ، (1) مللي لتر من مادة الاساس (0.8) مللي لتر من محلول هيدروكسيد الصوديوم (0.5 عياري) . اخلط جيدا ثم اضف (0.1) مللي لتر من مصل الدم .

نموذج القياس (standard) : اخلط في انابيب اختبار (فحص مزدوج) (1.1) مللي لتر من المحلول الدارىء . (1.0) مللي لتر من المحلول القياسي للفينول (0.8) مللي لتر من محلول هيدروكسيد الصوديوم (0.5 عياري) .

أنبوب الكفىء (blank) : اخلط في انابيب اختبار (فحص مزدوج) (1.1) مللي لتر من المحلول الدارىء . (1.0) مللي لتر من الماء المقطر ، (0.8) مللي لتر من محلول هيدروكسيد الصوديوم (0.5 عياري) ثم لجميع الانابيب المشار اليها اعلاه اضف : ـ

(1.2)مللي لتر من محلول بيكربونات الصوديوم (0.5 عياري) . (1.0) مللي لتر من محلول 4 ـ امينو ـ انتيبرين (4-amimo antipyrine) ، (1.0) مللي لتر من محلول سيانيد حديديك البوتاسيوم . مع ضرورة مزج محتويات كل انبوب جيداً قبل كل اضافة حيث ان الخلط الغير الجيد يؤدي الى نتائج غير منتظمة ولا يعتمد عليها .

أقرأ الكثافة الضوئية مباشرة عند الموجة الضوئية(0.1 مللي ميكرون) او مرشح الضوء من نوع (Ilford Green light filter No.614) ويجب تجنب تعرض الانابيب لضوء الشمس القوي وتقرأ جميع الانابيب بعد ضبط جهاز قياس الالوان مستخدما الماء .

جدول (21) تقدير نشاط الفوسفاتيز القلوي في مصل الدم .

المحلول*	النموذج	الكفيء النموذج	القياس	الكفيء
الداريء	1.0	1.0	1.1	1.1
مادة الأساس	1.0	1.0	—	—
	حضن لمدة 3 دقائق عند 37ْم .			
مصل الدم	0.1	—	—	—
	حضن لمدة 15 دقيقة عند 37ْم ثم أضف .			
هيدروكسيد الصوديوم	0.8	0.8	0.8	0.8
مصل الدم	—	0.1	—	—
فينول قياسي	—	—	1.0	
ماء مقطر	—	—	—	1.0
	أمزج جيداً ثم أضف .			
بيكربونات الصوديوم	1.2	1.2	1.2	1.2
	أمزج جيداً ثم أضف .			
4 - أمينوأنتي بيرين	1	1	1	1
	أمزج جيداً ثم أضف .			
سيانيد حديديك البوتاسيوم	1	1	1	1
	أمزج جيداً ثم أقرأ اللون عند 510 مللي ميكرون			

طبق طريقة الحساب كما هو موضح في التجربة .

• الحجوم الموضحة في الجدول بالمللي لتر .

الحساب : ان كمية الفينول الموجودة في الانبوب القياسي هي (10) ميكروغرام وعليه فان الفينول الناتج خلال (15) دقيقة في انبوب الفحص هو : $\frac{ء - س}{ق - ب} \times (10)$ ميكروغرام حيث ان :

ء = الكثافة الضوئية للنموذج المصل

س = الكثافة الضوئية لنموذج السيطرة

ق = الكثافة الضوئية لنموذج المحلول القياسي

ب = الكثافة الضوئية للكفيء

وبذا فان (100) مللي لتر من المصل تحرر :

$$\frac{ء - س}{ق - ب} \times (10) \times \frac{(100)}{(0.1)} \times \frac{1}{(1000)} \text{ ملليغرام}$$

وحيث ان وحدة (King–Armstrong) التي تعبر عن نشاط الانزيم تعادل تحرر (1) مللي غرام من الفينول خلال (15) دقيقة تحت ظروف الفحص الموضحة سابقا . ولذا فان

نشاط الفوسفاتيز القاعدي بالمصل = $\frac{ء - س}{ق - ب} \times (10)$ = وحدة (King–Armstrong)

ولفعاليات الانزيم التي تتراوح ما بين (30–60) وحدة يمكن تخفيف اللون النهائي باضافة (6) مللي لتر من الماء المقطر واعادة القراءة ثم الحساب والضرب في معامل التخفيف . اما لفعاليات الانزيم التي تزيد عن (60) وحدة فيجب اعادة تقدير نشاط الانزيم خلال خمسة دقائق من وقت الحضانة وضرب النتيجة في (3) .

وللتحويل الى وحدات دولية Mmol/min/L تضرب بالمعامل 3.53 .

القيم الطبيعية لنشاط الانزيم :

(3–13) وحدة (King – Armstrong) لكل (100) مللي لتر مصل في الكبار وان فعالية الانزيم في مصل الاطفال أكثر من هذا المعدل وقد تصل الى (25) وحدة .

المحاليل : المحلول الدارىء : (أ س ها 10)

زن (6.3) غرام من كاربونات الصوديوم اللامائية و (3.36) غرام من بيكربونات الصوديوم لكل لتر من الماء المقطر وأحفظ المحلول عند (4C°)م .

محلول المادة الاساس :

تركيز (0.01M) ثنائي صوديوم فوسفات الفينول تذاب (2.18) غرام من مادة الاساس في لتر من الماء المقطر ويغلى المحلول بسرعة لغرض قتل الكائنات الحية ثم يبرد فوراً ويضاف قليل من الكلوروفورم كمادة حافظة (4 مللي لتر/لتر) واحفظ عند درجة (4)م .

المحلول القياسي للفينول المخزون : (1 مللي غرام/ (1) مللي لتر) ذوب 1 غرام من الفينول المتبلور النقي في كمية من حامض الهيدروكلوريك (0.1) عياري ثم أكمل الى اللتر وأحفظ المحلول عند (4)°م في قنينة بنية .

المحلول القياسي للفينول العامل : (1 مللي غرام/ (100) مللي لتر).

خفف (1) مللي لتر من المحلول القياسي للفينول المخزون الى (100) مللي لتر من الماء المقطر . واضف بضع نقاط من الكلوروفورم كمادة حافظ عند (4)م في قنينة بنية .

محلول هيدروكسيد الصوديوم (0.5) عياري :

(20) غرام من هيدروكسيد الصوديوم النقي لكل لتر من الماء المقطر .

محلول بيكربونات الصوديوم (0.5) عياري :

(42) غرام من بيكربونات الصوديوم لكل لتر من الماء المقطر .

محلول (4-) امينوانتي بايرين : بتركيز (6) غرام من مادة (4-) امينوانتيبيرين (4-amino-antipyrine) لكل لتر من الماء المقطر . واحفظ في قنينة بنية .

محلول سيانيد حديديك البوتاسيوم :

(24) غرام من الملح النقي لسيانيد حديديك البوتاسيوم لكل لتر من الماء المقطر واحفظ في قنينة بنية .

الفوسفاتيز الحامضي (Acid Phosphataese)

يقوم الانزيم الفوسفاتيز الحامضي بتحليل استرات الفوسفات العضوية عند أ س هـ (ph 5.5–4.5) ويوجد هذا الانزيم بكثرة في نسيج البروستات والسائل المنوي (seminal fluid) كما يوجد ايضاً بكميات ملحوظة في عدد من الانسجة الاخرى مثل كريات الدم الحمراء الكبد والطحال والكلية والعظام .

وهناك عدة طرق للكشف والتفرقة بين انواع الفوسفاتيز التي توجد في الانسجة المختلفة وذلك عن طريق استخدام بعض المثبطات النوعية (specific inhibitors) التي تثبط نشاط نوع معين من الانزيم دون الانواع الاخرى . فالانزيم الذي يوجد في نسيج البروستات يثبط نشاطه تحت تأثير الترترات (L(+) tartrate) في حين ان نشاط الانزيم الموجود في كريات الدم الحمراء يثبط تأثير آيونات النحاسيك (Cu^{++}) وكذلك تحت تأثير الفورمالدهيد .

وان تقدير نشاط الفوسفاتيز الحامض في مصل الدم هام جداً في تشخيص انتشار البروستات السرطاني (metastatic cancer of the prostate) وكذا في تتبع سير المرض (progress) وتبلغ القيم الطبيعية لنشاط الانزيم من (1–3.5) وحدة (King–Armstrong)/(100) مللي لتر من المصل يثبط نشاط (0.8) وحدة تحت تأثير الترترات (اي الجزء الذي يمثل الانزيم البروستاتي) .

ويلاحظ ارتفاع ملحوظ في نشاط هذا الجزء الاخير في (75%) على الاقل من حالات انتشار البروستات السرطاني .

ومن الضروري الاشارة الى ان انزيم الفوسفاتيز الحامض من الانزيمات الغير ثابتة وحساسة جداً للتلف السريع ومن ثم فيجب فصل نموذج المصل بسرعة (لضمان عدم تسرب الانزيم من كريات الدم الحمراء) كما يجب ان لاتكون به اية آثار لتحلل كريات الدم الحمراء لنفس الغرض ويجب ان يتم اجراء التحليل في اسرع وقت (في حدود ساعتين من فصل الدم) مع المحافظة على النموذج بعيداً عن الحرارة وحفظه في مكان بارد ويجب ان يجمد ويحفظ في مجمدة اذا تأخر التحليل .

(تقدير النشاط الكلي للفوسفاتيز الحامض)

طريقة العمل :

نموذج المصل :

أخلط 1.0 مللي لتر من محلول السترات الدارىء (أ س هـا 4.9) ، (1) مللي لتر من محلول المادة الاساسي في أنبوب ُختبار وحضن لمدة (3) دقائق عند (37C°م) . ثم أضف (0.2) مللي لتر من مصل الدم وأمزج جيداً وحضن لمدة (1) ساعة . ثم اوقف التفاعل باضافة (1) مللي لتر من محلول هيدروكسيد الصوديوم (0.5) عياري .

(ولتقدير النشاط الخاص بأنزيم الفوسفاتيزِ الحامض البروستاتي) .

حضر انبوب آخر مثل السابق فقط اضف نقطة واحدة من محلول الترترات قبل اضافة نموذج المصل .

نموذج السيطرة :

اخلط جيداً (1) مللي لتر من المحلول الدارىء ، (1) مللي لتر من محلول مادة الاساس ، (1) مللي لتر من محلول هيدروكسيد الصوديوم (0.5 عياري) ثم اتبع ذلك بأضافة (0.2) مللي لتر من المصل .

نموذج القياس :

أخلط (1.2) مللي لتر من المحلول الدارىء ، (1) مللي لتر من محلول الفينول القياسي العامل (تركيز (1)مللي غرام/(100) مللي لتر) 1مللي لتر من محلول هيدروكسيد الصوديوم (0.5 عياري).

نموذج الكفيء :

اخلط (1.2) مللي لتر من المحلول الداريء ، (1) مللي لتر من الماء المقطر ، (1) مللي لتر من محلول هيدروكسيد الصوديوم (0.5 عياري) .

الى جميع الانابيب اضف :

(1) مللي لتر من بيكربونات الصوديوم (تركيز 0.5 عياري) ، واتبع ذلك باضافة (1) مللي لتر من محلول (4) امينو انتيپرين ، ثم (1) مللي لتر من محلول سيانيد بوتاسيوم الحديديك .

واخلط جيداً بعد اضافة كل محلول .

اقرأ الكثافة الضوئية للانابيب الثلاثة فور تكوين اللون عند الموجه (510) مللي ميكرون او مستخدماً مرشح (Ilford green filter – 624) وعدم تعريض اللون الى الضوء القوي ويحسب نشاط الانزيم طبقاً للمعادلة :

$$\frac{\text{ء} - \text{س}}{\text{ق} - \text{ب}} \times 10) \times \frac{(100)}{(0.2)} \times \frac{(1)}{(1000)}$$

حيث :

ء = الكثافة الضوئية لنموذج مصل الدم

س = الكثافة الضوئية لنموذج السيطرة

ق = الكثافة الضوئية للمحلول القياسي

ب = الكثافة الضوئية للمحلول الكفء

(0.2) = حجم المصل المستخدم .

(10) = تركيز المحلول القياسي المستخدم بالميكروغرامات

$\frac{1}{1000}$ = لتحويل كمية الفينول الى المللي غرام

ويمكن كتابة المعادلة باختصار $\frac{ء - س}{ق - ب}$ × (5) = وحدة (King – Armstrong)

/100 مللي لتر من مصل الدم

جدول (22) تقدير نشاط الفوسفاتيز الحامضي في مصل الدم .

المحلول*	النموذج	الكفىء النموذج	القياس	الكفىء
الداريء	1.0	1.0	1.2	1.2
مادة الأساس	1.0	1.0	—	—
	حضن لمدة 3 دقائق عند 37ْم .			
مصل الدم	0.2	—	—	—
	حضن لمدة ساعة عند 37ْم ثم أضف .			
هيدروكسيد الصوديوم	1.0	1.0	1.0	1.0
مصل الدم	—	0.2	—	—
فينول قياسي	—	—	1.0	—
ماء مقطر	—	—	—	1.0
	أمزج جيداً ثم أضف .			
بيكربونات الصوديوم	1	1	1	1
	أمزج جيداً ثم أضف .			
4 - أمينوأنتي بيرين	1	1	1	1
	أمزج جيداً ثم أضف .			
سيانيد حديديك البوتاسيوم	1	1	1	1
	أمزج جيداً ثم أقرأ اللون عند 510 مللي ميكرون .			

طبق طريقة الحساب كما هو موضح في التجربة .

* الحجوم الموضحة في الجدول بالمللي لتر .

المحاليل :

المحلول الدارىء :

(أ س ها 4.9) ويتم تحضيره باذابة (42) غرام من حامض السـتريك المتبلور في كميـة من المـاء ثم اضف (376) مللي لتر من محلول هيدروكسيد الصوديوم واحـد عيـاري واكمل الى اللتر بـالمـاء . راجع أ س ها على قياس كهربائي واضبطها بالضبط واحفظ عند درجـة (4)°م مع اضـافـة بضع نقط من الكلوروفورم كمادة حافظة .

محلول الترترات :

(1 M) يحضر بأذابة (15) غرام من حامض الترتريـك [L (+) tartrate] في حوالي (70) مللي لتر من المـاء ثم تضـاف (18.5) مللي لتر من محلول هيـدروكسيـد الصوديـوم (10) عيـاري واضبـط أ س ها عند (4.9) واكمل بالماء حتى (100) مللي لتر وأحفظ في زجـاجـة مغلقـة جيـداً . عنـد درجة (4)°م .

المحاليل القياسية : كما هي واردة تحت أنزيم الفوسفاتيز القاعدي .

تقدير نشاط انزيمي الفوسفاتيز القاعدي والحامضي في البول

حديثاً هناك تطبيقـات لتقـدير نشـاط هـذه الانزيمـات في البول للمسـاعـدة في تشخيص بعض امراض الجهاز البولي والاعضاء والانسجة المتصلة به وتتبع نفس الطرق المـذكورة اعلاه الا انه في حالة تقدير نشاط الفوسفاتيز الحامضي في البول فيجب تخفيف النموذج بنسبـة (50:1) أو ، (100:1) حيث ان نشاط هذا الانزيم مرتفع في بول الاصحـاء ويرتفع جـداً في حـالـة أمراض البروستات وتهتك انسجة الكلية والجهاز البولي (في أمراض البروستات تكون الزيادة عـائـدة الى النوع الحسـاس بتأثير الترترات ويستخدم (0.1) مللي لتر من البول المخفف . اما في حالـة تقـدير نشـاط الفوسفـاتيز القـاعـدي فيستخـدم (0.2) مللي لتر من البـول (بـدلاً من (0.1) من مصـل) لأنخفـاض نشـاط هـذا الانزيم في البول تبلغ القيم الطبيعيـة عنـد الاصحـاء (00–3.0) وحـدات الفوسفاتيز القاعدي ، (4.0–36.5) الفوسفاتيز الحامض .

تقدير نشاط الانزيم اميليز (Determination of amylase activity)

المقدمة :

ان انـزيم الاميليز يفرز من الغـدد اللعـابيـة (الاميليز اللعـابي salivary amylase) ومن البنكرياس (الاميليز البنكرياسي pancreatic amylase) ويقوم هـذا الانزيم بهضم السكريـات من نوع النشا والجليكوجين محللاً أياهـا الى سكريـات بسيطـة . وتعتمـد الطرق المستخدمـة في تقدير نشاط هذا الانزيم على :

أ - تقـدير كميـة النشـا التي يهضمهـا الانزيم تحت ظروف محـدودة من الحرارة والـوقت والحجم مستخدماً اليود ككاشف .

ب - تقدير السكريات البسيطة الناتجة من التفاعل بتطبيق احدى الطرق المستخدمـة لتقـدير الجلـوكـوز . وانـزيم الاميليز صغير الحجم ذو وزن جـزيئي يصـل الى (44.000) ويفرز بالادرار بواسطة الكلية بكميـات صغيرة وتزداد كميتهـا عنـد زيـادة تركيز الانزيم في مصل الدم وعند حدوث خلل في وظـائف الكليـة والتي تؤدي الى تسرب البروتينـات من مصل الدم الى الادرار . ومن أهم الحالات المرضية التي يستخدم تقـدير نشـاط الانزيم الاميليز في مصل الدم في تشخيصها وتتبعهـا نحو الشفـاء هو التهـاب البنكريـاس (pancreatitis) او وجود انسـداد في القنوات البنكرياسيـة (obstruction of pancreatic ducts) وفي هـذه الحالات يتسرب جزء كبير من الانزيم المتكون في نسيج البنكرياس الى الدورة الـدمويـة بدلاً من افرازه في تجويف الاثني عشري مما يؤدي الى ظهور ارتفاع كبير في نشاط الانزيم في الدم والذي بالتالي يفرز جزء منه أكثر من المعدل الطبيعي بالبول .

المعدل الطبيعي في مصل الدم :

(40-200) وحدة سوموجي (Somogyi unit) في كل (100) مللي لتر من مصل الدم .

الحالات المرضية التي يرتفع معدل نشاط الانزيم الاميليز في مصل الدم :

1) التهـاب البنكريـاس الحـاد (acute pancreatitis) وقـد يصل معـدل نشـاط الانـزيم الى (2000) وحدة لكل (100) مللي لتر من مصل الدم .

وأن ظهور معدلات تزيد على (550) وحدة في مصل الدم انما تؤكد وجود التهـاب البنكريـاس الحـاد وهـذه الزيـادة غـالبـاً مـاتكون مؤقتـة وتصل الى الحـد الاقصى خلال (12-24) ساعة من حدوث نوبـة الالتهـاب ثم تبـدأ في العودة الـى المستوى الطبيعي

خلال (2-3) ايام . وفي بعض حالات التهاب البنكرياس المزمن ووجود ورم بالبنكرياس قد يلاحظ ارتفاع محدود في مستوى نشاط الاميليز في مصل الدم .

2) هناك حالات يتأثر فيها نسيج البنكرياس بطريق غير مباشر (اي ثانوي) (secondary) نتيجة وجود اصابات في انسجة قريبة من ، او محيطة بالبنكرياس ويحدث عندئذ ارتفاع في مستوى نشاط الانزيم الاميليز في مصل الدم ومن بين هذه الحالات :

أ - قرحة المعدة المثقبة (perforated gastric ulcer)

ب - انسداد الامعاء (intestinal obstruction)

جـ - العمليات الجراحية على انسجة او اعضاء قريبة من البنكرياس .

د - بعض العقاقير التي تسبب انقباض في العضلة الحلقية المعروفة باسم (sphincter of odd) وذلك مثل عقار المورفين (morphine) .

هـ - قد يرتفع معدل نشاط الانزيم في حالات التهاب الغدة النكفية (mumps) لتأثير البنكرياس الثانوي .

الاميليز في البول :

ان تقدير الاميليز في البول له أهمية معينة في امراض البنكرياس ويعبر عن نشاط انزيم الاميليز في الادرار بعدد المللي لترات من محلول النشا تركيز (0.1%) والتي يتم هضمها بواسطة واحد مللي لتر من البول وخلال ثلاثين دقيقة وان القيم الاعتيادية محسوبة بالوحدات المذكورة اعلاه هي (6-30) وحدة لكل مللي لتر . وفي حالات التهاب البنكرياس الحاد قد تصل القيمة الى اكثر من (100) وحدة لكل مللي لتر من البول .

اساس طريقة تقدير نشاط الاميليز في البول

يتم تحضير تخفيفات مختلفة من البول باستخدام محلول فوسفات دارىء ذو أ س هـا (6.1) ويحضن عند درجة (37C)مْ لزمن محدد بعد ذلك يتم اضافة بضع نقط من محلول اليود لكل نموذج .

ان أول انبوب لايظهر فيه اي لون ازرق يدل على ان فاعلية الانزيم قادرة على هضم كمية النشا بالكامل ويؤخذ معدل تخفيف الادرار في هذا الانبوب كدلول للتعبير عن نشاط الانزيم الاميليز في نموذج الادرار الاصلي .

الطريقة :

يخفف الادرار بنسبة (5:1) باضافة مللي لتر واحد من البول الى (4) مللي لتر من المحلول الدارىء (أ س هـا 6.1) بعد ذلك توضع سبع انابيب اختبار صغيرة في حامل ويوضع في الانبوب الاول رقم (1)4 مللي لترات من البول الذي تم درئه (تخفيف 5:1) ويوضع (2) مللي لتر من المحلول الدارىء الى كل انبوب من الانابيب الستة الباقية من رقم (2) الى رقم (7) .

يتم نقل (2) مللي لتر من البول المخفف (5:1) من الانبوب رقم (1) الى الانبوب رقم (2) ويخلط ثم يتم تحويل (2) مللي لتر من الخليط الموجود في الانبوب رقم (2) (بول مخفف (10:1) الى الانبوب رقم (3) ليصبح تخفيف البول (20:1) وهكذا حتى يتم الوصول الى الانبوب رقم (7) حيث يصبح تخفيف البول (320:1) . وعندئذ يتم طرح (2) مللي لتر من محتويات الانبوب رقم (7) الى البالوعة . وبذا تكون نسبة تخفيف الادرار في الانابيب من رقم (1–7) هي :
(320:1, 160:1, 80:1, 40:1, 20:1, 10:1, 5:1) على التوالي وان كل انبوب يحتوي على (2) مللي لتر فقط من هذا الادرار المخفف . بعد ذلك يتم اضافة (1) مللي لتر من محلول النشا تركيز (0.2%) لكل أنبوب وتخلط جيداً محتويات الانابيب ويتم تحضين الانابيب في حمام مائي بدرجة (37)مْ ولمدة ثلاثين دقيقة وعند انتهاء الوقت يتم اضافة ثلاثة قطرات من محلول اليود (N1/50) لكل أنبوب ويلاحظ ظهور اللون الازرق من عدمه وتسجل هذه الملاحظة .

الحساب :

- دع تخفيف البول في أول انبوب لايظهر لوناً ازرقاً يكون (1 : س) .

- يحتوي هذا الانبوب على (2) مللي لتر من البول المخفف بنسبة (1) : س اى $\frac{(2)}{س}$ مللي لتر من البول من النموذج الاصلي . وعليه فأن $\frac{(2)}{س}$ مللي لتر من البول تحتوي على كمية من الانزيم

الاميليز تكفي لهضم (1) مللي لتر من محلول النشا تركيز (0.2%) خلال (30) دقيقة . وعليه فأن $\frac{(2)}{س}$ مللي لتر من بول تهضم (2) مللي لتر من محلول النشا تركيز (0.1%) خلال (30) دقيقة . اي ان (1) مللي لتر من البول تهضم $\frac{(2)}{\frac{(2)}{س}}$ = س مللي لتر من محلول النشا تركيز (0.1%) وعليه فأن عدد وحدات فوهيلكوث (Wohlgmuth) لكل مللي لتر بول تساوي س (معامل تخفيف dilution factor الانبوب) الذي تم فيه هضم النشا بصورة كاملة . وتعرف وحدة فوهلجموث لنشاط الانزيم الاميليز في البول كما يلي : هي نشاط الانزيم في واحد مللي لتر من البول الذي يمكن ان يهضم (1) مللي لتر من محلول نشا تركيز (0.1%) ويتم التعبير عن نشاط الانزيم بالادرار عادة بالنسبة لمحتوى البول المطروح خلال (24) ساعة .

جدول (23) خطوات تقدير نشاط أنزيم الاميلز في البول .

المحلول*	رقم الانبوب للنموذج						
	1	2	3	4	5	6	7
بول مخفف (5:1)	4	2	2	2	2	2	2
محلول دارىء	—	2	2	2	2	2	2
النشـا	1	1	1	1	1	1	1
	تحضن الأنابيب في حمام مائي عند 37ْم لمدة 30 دقيقة ثم تضاف						
قطرات من اليود	3	3	3	3	3	3	3
	لاحظ ظهور اللون الازرق من عدمه مع مدى نسبة التخفيف .						
نسبة التخفيف	5	10	20	40	80	160	320

أحسب نشاط الانزيم الأميلز في عينة البول حيث انها تساوي مقلوب التخفيف . معبراً عنه بوحدات فوهلكوث كما هو موضح في التجربة .

* الحجوم الموضحة في الجدول بالمللي لتر .

المحاليل :

1 - دارىء الفوسفات (أ س ها) (6.1) :

يتم عمله بخلط محلولين (أ و ب)

خذ (11.860) غرام من ($Na_2HPO_4.2H_2O$) او (23.90) غرام ($Na_2HPO_4.12H_2O$) لامائي او Na_2HPO_4 (9.47gm) .

محلول (أ) تركيز (1/15) مول من فوسفات ثنائي الصوديوم يتم أذابة (11.86) غرام من فوسفات ثنائي الصوديوم في كمية من الماء المقطر المغلي لتوه ويكمل الحجم الى لتر واحد .

محلول (ب) يحضر باذابة (9.078) غرام من فوسفات ثنائي البوتاسيوم في كمية من الماء المقطر المغلي لتوه ثم يكمل الحجم الى لتر واحد .

ويتم حفظ هذين المحلولين بقناني پولي اثيلين ويتم تحضير الفوسفات الدارىء أ س ها (6.1) المستخدم في الطريقة بخلط (15) ملي لتر من محلول (أ) مع (85) ملي لتر من محلول (ب) .

2 - محلول النشا (0.2%) :

يتم مزج (0.2) غرام من النشا القابل للذوبان في انبوب اختبار مع قليل من الماء البارد ويتم بعدئذ معالجة المعجون المتكون بحوالي (80) ملي لتر من الماء المغلي في دورق . بعد ذلك يتم تبريد المحلول الى درجة حرارة الغرفة وينقل الى قارورة مدرجة ويكمل الحجم الى (100) ملي لتر .

3 - محلول اليود (0.1) عياري :

يتم اذابة (12.7) غرام من بلورات اليود النقي في محلول متكون من (20) غرام ايوديد البوتاسيوم مذابة في قليل من الماء المقطر ويكمل الحجم الى لتر واحد .

4 - محلول يود (0.02) عياري :

يتم الحصول عليه بالتخفيف الملائم لليود (0.1) عياري مع الماء المقطر .

تقدير نشاط انزيم الاميليز في مصل الدم :

الطريقة :

أن أ س هـا الاوفق لنشـاط الانزيم الاميليز الموجود في مصل الـدم هـو من (6.5-7) وان وجود ايونات الكلوريد تساعد على تنشيط فاعلية الانزيم ولـذا فعنـد تخفيف نموذج مصل الـدم يجب استخـدام محلول ملح كلوريـد الصوديوم الفيزيولوجي كما ينصح بوضع قطع من الصوف او القطن كسدادات في فوهة الماصة لتجنب سريان اي أثر للعاب والذي يؤدي الى حدوث ارتفـاع كبير غير حقيقي في نشاط الانزيم في النموذج تحت الفحص .

انبوب الاختبار :

- خفف المصل بنسبـة (10:1) بـاستعمال محلول ملحي (كلوريـد الصوديوم الفيزيولـوجي تركيز 0.9%) .
- حول بماصة (1) مللي لتر من محلول الاساس النشا الدارىء في انبوب اختبار وضع الانبوب في حمام مائي بدرجة (37C)مْ .
- اضف بعد ثلاثة دقائق (0.1) مللي لتر من مصل الدم المخفف وأخلط بلطف ، ضع الانبوب في الحمام المائي وبهدوء وحضن لمدة (15) دقيقة بالضبـط ارفع الانبوب من الحمـام وأضف (0.4) مللي لتر من محلول اليود المتداول تركيز(0.2%) وأخلط جيداً وبعدهـا أضف (8.5) مللي لتر من المـاء المقطر وأخلط .

السيطرة :

اخلط بالتتابع مللي لتر واحد من محلول الاساس النشا الدارىء (8.6) مللي لتر من الماء المقطر ثم (0.4) مللي لتر من محلول اليود المتداول .

قـارن الالوان فوراً عنـد (660 mu) مللي ميكرون او مستخـدمـاً مرشح الضـوء الاحمر الفاتح رقم Ilford red filter 608 مع استخـدام المـاء المقطر ككفوء لضبـط الجهـاز . بمـا ان أنبوب السيطرة يحتوي على (0.4) مللي غرام من النشـا فأن كمية النشا التي تم هضمها بواسطـة نموذج مصل الدم المستخدم هي :

$$\frac{\text{س} - \text{ف}}{\text{س}} \times (0.4) \text{ مللي غرام}$$

جدول (24) تقدير نشاط الاميلز في مصل الدم .

المحلول*	النموذج	الكفيء
مادة الاساس/ الداريء	1	1
	حضن لمدة 3 دقائق عند 37ْم	
مصل مخفف (10:1)	0.1	—
	أمزج جيداً وحضن عند 37ْم لمدة 15 دقيقة ثم ارفع من الحمام وبرد وأضف .	
اليود	0.4	0.4
	أخلط جيداً .	
ماء مقطر	8.5	8.6
	أخلط جيداً وأقرأ اللون عند 660 مللي ميكرون	

أحسب نشاط الانزيم مقدراً بوحدات سوموجي كما هو موضح في التجربة .

* الحجوم الموضحة في الجدول بالمللي لتر .

وحيث ان وحدة الاميليز سوموجي لنشـاط الانزيم في مصل الـدم تعرف بكميـة الانزيم التي يمكنها هضم (5) مللي غرامات من النشـا تحت ظروف محـددة من الحرارة وفترة التحضين المشار اليها اعلاه :

فعليه فأن نشاط الانزيم الموجود في (0.01) مللي لتر من نموذج المصل هي :

$$\frac{س - ف}{س} \times \frac{(0.4)}{(5)}$$ وحدات سوموجي

وبذا فان نشاط الانزيم في (100) مللي لتر من مصل الدم =

$$\frac{س - ف}{س} \times \frac{(0.4)}{(5)} \times \frac{(100)}{(0.01)}$$

حيث س = قراءة الكثافة الضوئية لانبوب السيطرة

ف = قراءة الكثافة الضوئية لانبوب نموذج الفحص .

$$\frac{س - ف}{س} \times (800)$$

ويلاحظ انه اذا كانت قراءة الاختبـار أقل من نصف قراءة السيطرة يجب أعـادة التقـدير مبتدئاً بنموذج من المصـل أكثر تخفيفاً مستخدماً محلول ملح كلوريد الصوديوم الفيزيولوجي .

وللتحويل الى وحدات دولية Mmol/min /L تضرب بالمعامل 1.85

المحاليل :

محلول الاساس النشا الداریء (أ س ها 7.0) :

- اذب (13.3) غرام من فوسفات الصوديوم ثنائية الهيدروجين الجافة أو (33.5) غرام من ملح ($NA_2HPO_4.12H_2O$) و (4.3) غرام من حامض البنزويك في (250) مللي لتر من الماء وسخن للغليان .
- امزج (0.2) غرام من النشا القابل للذوبان مع (5-10) مللي لتر من الماء المقطر البارد في كأس زجاجي لتكوين عجينة متجانسة ثم أضف العجينة الى الخليط المغلي السابق مع غسل بقايا العجينة بالكأس بكميات اضافية من الماء البارد واستمر في الغليان لمدة دقيقة واحدة ثم برد الى حرارة الغرفة وخفف الى (500) مللي لتر بالماء المقطر وأحفظ المحلول بدرجة (4C) مئوية ويلاحظ ضرورة تحضير هذا المحلول طازجاً على فترات شهرياً .

محلول اليود المخزون (stock) (0.1 N) عياري :

اذب (13.5) غرام من اليود النقي المتسامي (sublimed) النقي في محلول محضر بذوبان (24) غرام من يوديد البوتاسيوم في حوالي (100) مللي لتر من الماء المقطر وأكمل الى لتر واحد .

محلول اليود المتداول (working) (0.01 N) عياري :

اذب (50) غرام من فلوريد البوتاسيوم في قليل من الماء واضف (100) مللي لتر من محلول اليود المخزون واكمله الى لتر بالماء المقطر ، وأحفظ في زجاجة بنية عند (4 C)مْ .

نشاط انزيم الليبيز في مصل الدم
(Serum lipase activity)

ان فعالية ونشاط الانزيم المحلل او الحال للدهون والذي يوجد في مصل الدم (الليبيز) يمكن تعينها بتقدير كية المستحلب من زيت الزيتون او جليسريد ثلاثي آخر مثل ثلاثي البيوتيرين (tributyrin) التي يتم حلها بواسطة كمية معينة من مصل الدم وفي وقت محدد عند درجة (37 C))مْ ، ويتوقف تقدير نشاط الانزيم الليبيز على تقدير كمية الحامض الدهني الذي ينتج من خلال عملية التحلل للجلسريد الثلاثي بواسطة الانزيم . وكمية الحامض هذه يمكن تقديرها بعدة طرق: (أ) تقدير التغير في قيمة أسها في المحلول، (ب) بقياس ثاني أوكسيد الكاربون المتصاعد عند تفاعل المحلول الناتج بعد فعالية الانزيم مع بيكربونات الصوديوم ، (ج) معايرة الحامض الدهني الناتج بواسطة محلول قياسي مخفف من هيدروكسيد الصوديوم ، وهذه الطريقة هي اسهل الطرق وأدقها وبالمثل الطريقة الاولى بتعيين التغير في أسها . وبتطبيق طريقة التسحيح يلزم تعيين الحجم من محلول هيدروكسيد الصوديوم بتركيز (0.05) عياري اللازم لمعادلة الحامض الدهني الناتج من تحلل الجلسريد الثلاثي خلال ساعة عند درجة (37)مْ يتأثر (1) مللي لتر من المصل . ويبلغ المدى الطبيعي لنشاط الانزيم في مصل الدم عند الاشخاص الطبيعين في حدود (1) مللي لتر وهي تعرف بوحدة (Tiets and Fiereck) وهي تعادل (0.277) وحدة دولية على (1) مللي لتر أو (277) وحدة دولية/ اللتر .

ان الزيادة في نشاط الانزيم الليبيز في مصل الدم انما هي انعكاس لمرض البنكرياس وحدوث التهاب في الانسجة وتحطيم خلاياه مما يؤدي الى تسرب الانزيم الى الدورة الدموية بنفس الطريقة التي يتسرب بها الاميليز البنكرياسي. لأن دراسة التغير في نشاط الانزيم الليبيز في مصل الدم يتفق في بعض الاوجه ويختلف في البعض الآخر عند دراسة التغير في نشاط الانزيم الاميليز في مصل الدم في حالات امراض البنكرياس . فكما يحدث في نشاط الانزيم الاميليز فأن نشاط الانزيم الليبيز يزداد في حالات التهاب البنكرياس الحاد عند بداية المرض وظهور الاعراض الحادة مثل آلالام الحادة في البطن (acute abdominal pain) وقد تم تسجيل قيم عالية وصلت الى (2800) وحدة دولية/اللتر ولكن الانخفاض في نشاط الانزيم الكبير الذي يلي ذلك يكون أكثر تدرجاً عنه في حالة الاميليز. فقد لوحظ بقاء نشاط الانزيم الليبيز مرتفعاً في عدد من الحالات ولمدة عشرة أو اربعة عشر يوماً أو أكثر (اي ان انتزاعه من الدورة الدموية يكون أقل عما هو في حالة الاميليز) . واستناداً على هذه الحقيقة فأن التشخيص الدقيق لالتهاب البنكرياس الحاد غالباً مايكون ممكناً بتعين نشاط الليبيز في مصل الدم بعد ان

ينخفض مستوى الاميليز ويعود الى المستوى الطبيعي ويتم تفضيل هذا الاجراء عن بقية الاختبارات الاخرى في التهاب البنكرياس الحاد . وفي الحالات الغير حادة فأن نشاط انزيم الليبيز في المصل تكون أكثر انحرافاً وزيادة عن الحد الطبيعي مما يحدث ويلاحظ في نشاط انزيم الاميليز وان كان بعض العلماء لايتفق مع هذا الرأي الاخير . /وفي الواقع فأن تقدير نشاط كلا الانزيمين في نفس الوقت في مصل المريض قد يكون ذو قيمة تشخيصية أكثر .

طريقة العمل :

- الاختبار (Test) :-

أ - توضع (10)سم من المحلول المنظم veronal buffer pH (8.2) في انبوبة اختبار ويضاف اليها (0.3)سم من الجليسريد ثلاثي البيوترين ويمزج جيداً ثم يضاف (0.2)سم من مصل الدم وتحضن الانبوبة عند (37)مْ لمدة (3) ساعات .

ب - يضاف الى الانبوبة (3)سم من الكحول الاثيلي (95%) مع المزج جيداً وذلك لايقاف التفاعل .

جـ - يضاف (2-3) قطرات من محلول ثيمولفثالين ثم تتم عملية تسحيح مستخدماً محلول هيدروكسيد الصوديوم تركيز (0.05) عياري .

السيطرة (Control) :-

يوضع (10)سم من المحلول المنظم في انبوبة اختبار ثم يضاف (0.3) سم من محلول الجليسريد ثلاثي البيوترين ويحضن عند (37)مْ ، لمدة (3) ساعات ثم يبرد ويضاف اليه (3) سم من كحول الاثيلي (95%) ويمزج الخليط جيداً ، ثم يضاف (0.2) سم من مصل الدم .

ب - يستكمل التجربة كما جاء تحت الاختبار في الفقرة جـ .

جدول (25) تقدير نشاط الليبيز في مصل الدم .

المحلول*	النموذج	الكفيء
المنظم	10	10
ثلاثي البيوتيرين	0.3	0.3
	يمزج جيداً ويحضن لمدة 3 دقائق عند 37ْم	
مصل الدم	0.2	—
	يمزج جيداً ويحضن عند 37ْم لمدة 3 ساعات ثم يبرد ويضاف .	
كحول إيثيلي 95%	3	3
مصل الدم	—	0.2
ثيوفثالين (بالنقط)	3	3
	يرج جيداً ثم يضاف .	
	سحح باستخدام هيدروكسيد الصوديوم $\frac{N}{20}$	

طبق طريقة الحساب كما هي موضحة في التجربة .

* الحجوم الموضحة في الجدول بالمللي لتر .

الكواشف :-

- المحلول المنظم veronal buffer pH 8.2 :-

توزن (1.2371) غرام من باربيتون الصوديوم و (0.1571) غرام من بوتاسيوم فوسفات احادي الهيدروجين . و (17.535) غرام من كلوريد الصوديوم ثم يضاف (11.6) سم من (0.1)N من كلوريد الهيدروجين ويذاب الجميع في لتر من الماء المقطر .

- محلول جليسريد ثلاثي البيوتيرين .
- الكحول الاثيلي (95%) .
- هيدروكسيد الصوديوم N(0.5) ويخفف عشر مرات قبل الاستخدام مباشرة .
- ثيمولفتالين (1) غرام/(100) سم من الكحول الاثيلي) .

طريقة الحساب :-

(T–C) X 5 = Lipase activity Tietz and Fiereck units/ml)

حيث ان :

T = حجم محلول هيدروكسيد الصوديوم المستخدم في تسحيح الاختبار .

C = حجم محلول هيدروكسيد الصوديوم المستخدم في تسحيح الـ (control) .

ويمكن تحويل هذه الوحدات الى وحدات عالمية .

حيث ان وحدة

0.277 I.U./ml = Tietz and Fie reck

أو or 277 I.U./Litre .

تقدير نشاط الانزيم الكولين أستريز في مصل الدم (Cholinesterases)

• أن أنزيمات الكولين استريز هي مجموعة من الانزيمات التي تحلل خلات الكولين (acetylcholine) الى حامض الخليك الكولين . وهناك نوعين من هذه الانزيمات :

أ) كولين الاستريز الكاذب (pseudocholinesterases) ويوجد في الكبد ومصل الدم والكبد هو المصدر الرئيسي للأنزيم الذي يوجد بمصل الدم .

ب) كولين الاستريز الحقيقي (true–cholinesterase) ويوجد بصفة اساسية في نسيج الجهاز العصبي وكذلك في كريات الدم الحمراء .

ويثبط نشاط هذه الانزيمات عديد من مركبات الفوسفور العضوية (compounds organic phosphorus) وعديد من المركبات التي تستخدم كغازات سامة (warfar gases) في الحروب . وان تقدير نشاط هذه الانزيمات هام جداً لتشخيص امراض الكبد (كولين الاستريز الكاذب) وفي حالة التسمم بالمركبات المذكورة اعلاه (الكولين استريز الحقيقي) وخاصة بين المزارعين في مواسم استخدام المبيدات الحشرية من نوع مركبات الفوسفور العضوية . وتعتمد طرق تقدير نشاط هذه الانزيمات على تقدير حامض الخليك المتحرر من تحلل خلات الكولين تحت فعالية الانزيم . وحامض الخليك يمكن تقديره (1) بتعيين التغير في أ س ها (PH = change in PH) ، (2) بالتسحيح بمحلول هيدروكسيد الصوديوم . ويبلغ معدل نشاط الانزيم (1.10–0.60) تغير في أ س ها/(1) مللي لتر من مصل الدم او (3.8–2.5) مللي لتر (Na–OH N/50) مللي لتر من مصل الدم .

طريقة العمل :

ضع (2) مللي لتر من المحلول الدارىء في انبوب اختبار ثم أضف (0.5) مللي لتر من مصل الدم . ضع الانبوب في حمام دافىء ع د (25م) ثم اضف (0.2) مللي لتر من المادة الاساس (0.165M) من خلات الكولين مع المزج السريع وتسجيل الوقت بدقة وضع الانبوب في حمام مائي عند (25)م واتركه لمدة ساعة ثم سحح مستخدماً محلول (N/50) هيدروكسيد الصوديوم ومستعيناً بالفينولفثالين ككاشف (indicator) وتسجيل النتائج بعدد المللي لترات من محلول هيدروكسيد الصوديوم/ (1) مللي لتر من مصل الدم .

جدول (26) تقدير نشاط الكولين أستيريز الكاذب في مصل الدم .

المحلول*	النموذج
الداريء	2
مصل الدم	0.5
	حضن في حمام مائي عند 25°م لمدة 3 دقائق .
مادة الاساس	0.2
	أمزج جيداً وحضن عند 25°م لمدة ساعة بالضبط ثم سحح بهيدروكسيد الصوديوم $\frac{N}{60}$ مستخدماً فينولفثالين كدليل .

أحسب نشاط الانزيم بعدد المللي لترات من هيدروكسيد الصوديوم التي تعادل نشاط الانزيم في واحد مللي لتر من مصل الدم .

* الحجوم الموضحة في الجدول بالمللي لترات .

المحاليل :

1 - المحلول المنظم :

تركيز (0.006) مولار باربيوتيورات الصوديوم (1.2371) غرام/اللتر ، (0.001) مـولار ثنائي هيدروجين فوسفات البوتـاسيوم (0.1361) غرام/اللتر ، (0.30) مولار كلوريـد الصوديوم (17.535) غرام/ اللتر لتحضير لتر من المحلول اذب هذه الكميات في (900) مللي لتر من المـاء ثم أضف (11.6) مللي لتر من (0.1) عياري حامض الهيدروكلوريك ثم أكمل الحجم الى اللتر بالماء . أن أ س ها للمحلول تساوي (8.0) عند درجة (25)مْ .

2 - محلول خلات الكولين :

(0.165 مولار) يحتوي على (3.00) غرام من كلوريـد خـلات الكـولين (acetylcholine chloride) في (100) مللي لتر من الماء .

ملحوظة :

تضاف بضع قطرات من التولين كمادة حافظة لجميع المحاليل وتحفظ بـالثلاجة عنـد درجـة (4C)مْ .

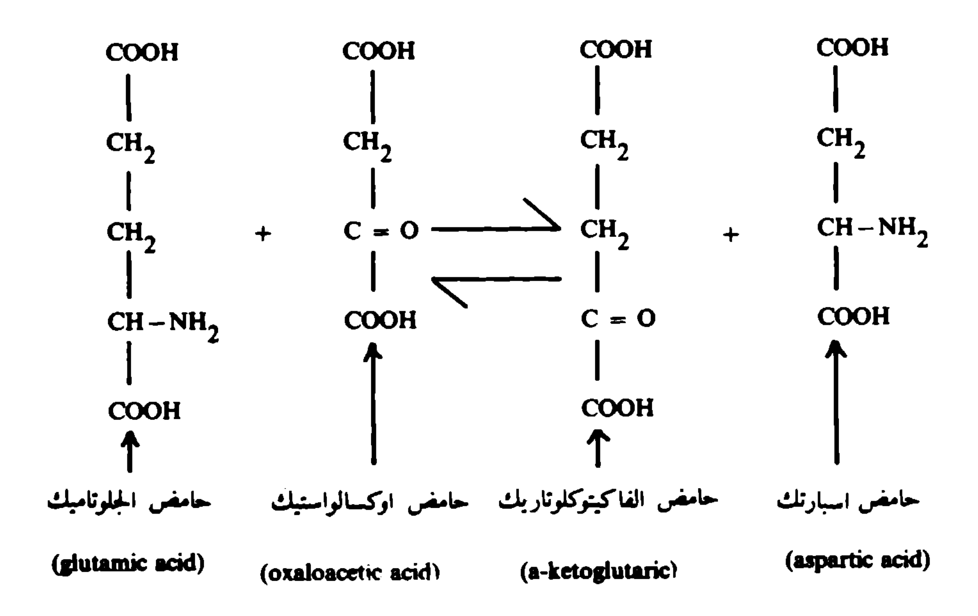
تقدير نشاط الانزيمات من نوع الترانس امينيز
(Determination of transaminases enzymes in serum)

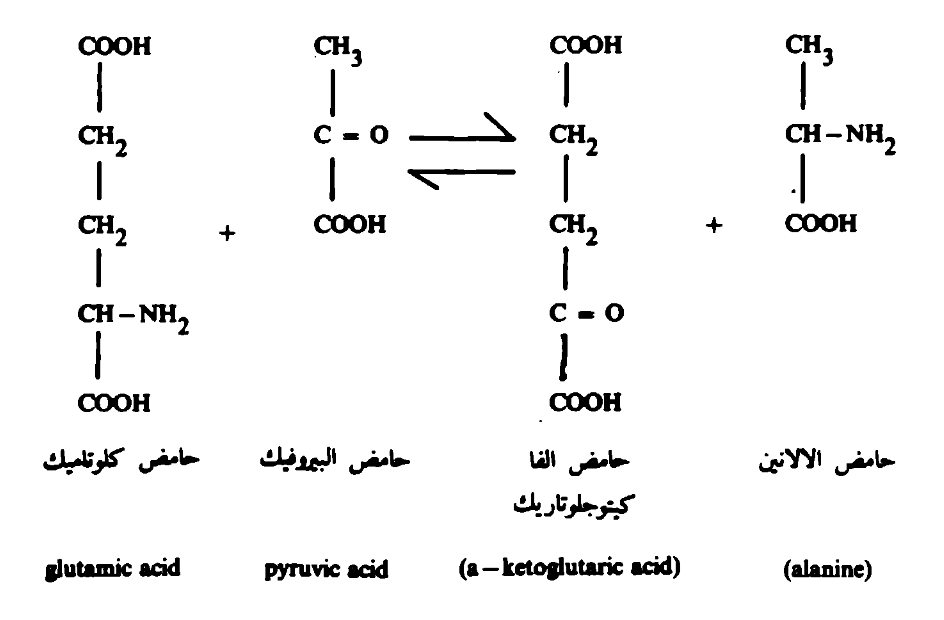
1) الجلوتاميك اوكسال استيك ترانس امينيز في مصل الدم
(Serum Glutamic Oxalo – acetic Transaminase (GOT)

معلومات عامة :

ان انتقال المجموعة الامينية (amino group) من حامض اميني (amino acid) الى حامض كيتوني (keto–acid) من العمليات الحياتية الهامة في تمثيل الاحماض الامينية . وتتم هذه العملية في انسجة جسم الانسان من خلال فعالية مجموعة من الانزيمات التي تساعد على اتمام هذه التفاعلات ويطلق على هذه المجموعة من الانزيمات اسم ترانس امينيز نسبة الى قدرتها على نقل مجموعة الامين ومن أمثلتها انزيم جلوتاميك اوكسال استيك ترانس امينيز (Glutamic oxalo – acetic transaminase) ويختصر الى (GOT) وانزيم كلوتاميك بيروفيك ترنس امينيز (Glutamic pyruvic transaminase) ويختصر (GPT) .

وتمثل المعادلات الآتية التفاعلات التي تتم تحت فعالية هذين الانزيمين :





ينتشر كلا الانزيمين من نوع الترانس امينيز في كثير من انسجة جسم الانسان وغالباً مايكون نشاط الانزيم من نوع (GOT) أكثر فعالية من نشاط الانزيم من نوع (GPT) ويكثر نوع (GOT) بصورة خاصة في نسيج القلب والكبد كما وان العضلات الميكلية (skeletal muscles) والكلية من المصادر الغنية لهذا الانزيم . يحتوي الكبد على كميات كبيرة من انزيم (GPT–) كما وان الانسجة الاخرى مثل الكلية ، القلب ،والعضلات الميكلية تحتوي على كميات وافية من هذا الانزيم ، ان مستوى الانزيمات من نوع ترانس امينيز قليل في مصل الدم وعليه فأن تأثر الاعضاء وخاصة الغنية منها بهذه الانزيمات والذي ينتج عنه تحطيم وموت بعض خلايا هذه الاعضاء او يؤدي الى زيادة نفاذية جدار هذه الخلايا فأنما يؤدي الى تسرب هذه الانزيمات الى الدورة الدموية ومن ثم زيادة فعالية هذه الانزيمات في مصل الدم ولذا فأن ارتفاع مستوى نشاط هذه الانزيمات ومدى هذا الارتفاع في مصل الدم كثيراً مايستخدم في المساعدة على دقة التشخيص .

يرتفع نشاط انزيم (GOT) في مصل الدم بسرعة بعد احتشاء عضلة القلب (myocardial infarction) وقد يصل المعدل الى قيم تتراوح مابين (2–20) ضعف المعدل الاعتيادي وذلك خلال (24–48) ساعة من بدء الاصابة ويبدأ معدل نشاط الانزيم في النقصان وقد يعود المستوى الى المعدل الطبيعي خلال (3–5) ايام .

وفي حالات احتشاء القلب غالباً لا يرتفع اعتيادياً مستوى نشاط (GPT) في مصل الدم الا اذا كانت المنطقة المصابة كبيرة . أما نشاط هذا الانزيم (GPT) فانه يرتفع بشكل ملحوظ في

الحالات المرضية التي يتأثر فيها نسيج الكبد مع حدوث زيادة في نفاذية الخلايا ، نظراً لكثرة الانزيم في السيتوبلازم كما ويرتفع نشاط كل من (GOT) (GPT) اذا حدث تهتك او تحطم لخلايا الكبد (hepato;cellular damage) حيث ان (GOT) يوجد بكثرة في الميتوكندريا (mitochondria) . ويصل معدل (GOT/GPT) في مصل الدم من (1–1.3) وفي حالة زيادة نفاذية جدران خلايا الكبد وتسرب الانزيم (GPT) فان نسبة (GOT/GPT) في مصل الدم ستنخفض في حين ان تسرب كل من (GOT) ، (GPT) قد يحافظ على هذه النسبة ثابتة او قد تزداد اذا فاقت كمية (GOT) كمية (GPT) .

طريقة العمل :

أجمع (3–4) مللي لترات من الدم الوريدي واتركها في وضع مستقر لمدة عشرة دقائق حتى يتم التخثر . انبذ وافصل فوراً المصل من الجلطة وذلك حتى لاتتسرب الانزيمات من كريات الدم الحمراء والبيضاء واحفظ المصل بدرجة (4)مْ ولحين الفحص . أما اذا تم حفظ النموذج لليوم التالي فعندئذ يجب الحفظ في درجة حرارة منخفضة (– 20مْ للتجمد) وذلك للعمل على المحافظة على فعالية ونشاط الانزيم .

الاجراء :

انبوب الفحص :

دفىء (0.5) مللي لتر من مادة الاساس في حمام مائي عند درجة (37)مْ ولمدة ثلاثة دقائق . أضف (0.1) مللي لتر من مصل الدم واخلط بهدوء ثم حضن لمدة (60) دقيقة تماماً وارفع الانابيب من الحمام المائي ثم أضف فوراً (0.5) مللي لتر من محلول ثنائي نيتروفينيل هيدرازين (2:4 dinitrophenyl – hydrazine (DNPH) وأخلط جيدا . ان الاضافة الاخيرة تعمل على ايقاف نشاط الانزيم كما انها تؤدي الى تحول الحامض الكيتوني الناتج الى مشتق (الهيدرازون) .

أنبوب الكفىء للفحص (test blank) :

أخلط (0.5) مللي لتر من مادة الاساس مع (0.5) مللي لتر من محلول (DNPH) ثم اضف (0.1) مللي لتر من مصل الدم .

أنبوب المحلول القياسي :

أخلط (0.1) مللي لتر من محلول البيروفيت القياسي المتداول (working pyruvate) مع (0.4) مللي لتر من محلول المادة الاساس ، (0.1) مللي لتر مـاء مقطر (0.5) مللي لتر (DNPH) .

انبوب الكفىء القياسي :

أخلط (0.5) مللي لتر من مادة الاساس ، (0.1) مللي لتر ماء (0.5) مللي لتر من محلول (DNPH) في انبوب اختبار .

أترك جميع الانابيب المذكورة اعلاه لمدة (20) دقيقة بدرجة حرارة الغرفة ليتم تفاعل (DNPH) مع الاحماض الكيتونية الناتجة وبعدها اضف (5) مللي لترات من محلول هيدروكسيد الصوديوم (0.4) عياري واخلط جيداً واترك لمدة عشرة دقائق لاتمام تكوين وظهور اللون .

قارن الالوان عند الموجة الضوئية (510 مللي ميكرون) او مستخدماً مرشح أخضر (green filter 624 Ilford) وأقرأ الانابيب مع ضبط الجهاز مستخدماً الماء .

جدول (27) تقدير نشاط الأنزيم GOT في مصل الدم .

المحلول*	النموذج	كفىء النموذج	القياس	كفىء القياس
مادة الاساس/الداريء	0.5	0.5	0.4	0.5
المحلول القياس	—	—	0.1	
	حضن في حمام مائي عند 37م لمدة 3 دقائق .			
مصل الدم	0.1	—	—	—
	حضن في حمام مائي عند 37م لمدة 60 دقيقة ثم أضف فوراً .			
ماء مقطر	—	—	0.1	0.1
ثنائي نيتروفينيل هيدرازين	0.5	0.5	0.5	0.5
	أخلط جيداً .			
مصل الدم	—	0.1	—	—
	أخلط جيداً واترك لمدة 20 دقيقة عند 25م وأضف .			
هيدروكسيد الصوديوم	5	5	5	5
	أخلط جيداً وأترك لمدة 10 دقائق ثم أقرأ اللون عند 510 مللي ميكرون			

أحسب نشاط الأنزيم كما هو موضح في التجربة .

* الحجوم الموضحة في الجدول بالمللي لترات .

الحساب :

ان بيروفيت الصوديوم الناتجة هي المسؤولة عن الاختلاف بين تركيز اللون في انبوبي الفحص وكفىء الفحص .

ان تركيز بيروفيت الصوديوم في (0.1) مللي لتر من القياسي العامل تساوي (0.4 mM) وهي التي تنتج عنها الاختلاف بين أنبوبي القياسي . وعليه فأن البايروفيت الناتجة خلال (60) دقيقة من (0.1) مللي لتر من مصل الدم وهي :

$$\frac{\text{ت} - \text{كت}}{\text{س} - \text{كس}} \times (0.4) \text{ ميكرومول}$$

حيث ت = قراءة الاختبار

كت = قراءة كفىء الاختبار

س = قراءة المحلول القياسي

كس = قراءة كفىء المحلول القياسي .

وعليه فأن البايروفيت الناتجة في دقيقة واحدة في لتر من مصل الدم هي :

$$\frac{\text{ت} - \text{ك ت}}{\text{س} - \text{ك س}} \times (0.4) \times \frac{(1)}{(60)} \times \frac{(1000)}{(0.1)} = \frac{\text{ت} - \text{ك ت}}{\text{س} - \text{ك س}} \times (67)$$ ميكرومول/دقيقة/لتر .

ويتم تحويل البايروفيت المحسوبة الى وحدات دولية باللتر بالرجوع الى الجدول التالي :

the relation of the umole of pyruvate per min. per litre in the colorimetric reaction to international Units spectrophotometrically at 25 .

Calculated pyruvate (umole per min. per litre)	GOT result in I.U.	GPT result in I.U.	Calculated pyruvate (umole per min. per litre)	GPT result in I.U.
2	2	1	56	24
4	3	2	58	25
6	5	2	60	26
8	6	3	62	27
10	7	4	64	29
12	9	4	66	30
14	11	5	68	31
16	13	6	70	33
18	15	7	72	34
20	17	7	74	35
22	19	8	76	36
23	20*	8	78	37
24	21	9	80	38
26	23	9	82	39
28	25	10	84	40
30	27	11	86	42
32	29	12	88	44
34	31	13	90	46
36	33	14	92	48
38	35	15*	94	50
40	37	16	96	52
42	39	17	98	54
44	41	18	100	56
46	44	19	102	60
48	47	20		
50	51	21		
52	55	22		
54	60	23		

* **indicates upper limit of normal.**

جدول يبين المعدلات لتحويل نشاط الانزيمات (GOT) (GPT) من وحدات اعتيادية الى وحدات دولية .

طريقة تقدير نشاط (GPT) :

اتبع نفس الخطوات التي سبق شرحها لتعيين نشاط (GOT) ماعدا استخدام مادة اساس خاصة (وهي كما موضح تحت المحاليل ادناه ، لهذا الانزيم مع تقليص فترة الحضانة الى ثلاثين دقيقة .

جدول (28) تقدير نشاط الأنزيم GPT في مصل الدم .

المحلول*	النموذج	كفىء النموذج	القياس	كفىء القياس
مادة الاساس/الداريء	0.5	0.5	0.4	0.5
المحلول القياس	—	—	0.1	
	حضن في حمام مائي عند 37م لمدة 3 دقائق .			
مصل الدم	0.1	—	—	—
	حضن في حمام مائي عند 37م لمدة 30 دقيقة ثم أضف فوراً .			
ماء مقطر	—	—	0.1	0.1
ثنائي نيتروفيل هيدرازين	0.5	0.5	0.5	0.5
	أخلط جيداً .			
مصل الدم	—	0.1	—	—
	أخلط جيداً واترك لمدة 20 دقيقة عند 25م وأضف .			
هيدروكسيد الصوديوم	5	5	5	5
	أخلط جيداً وأترك لمدة 10 دقائق ثم أقرأ اللون عند 510 مللي ميكرون			

أحسب نشاط الأنزيم كما هو موضح في التجربة .

* الحجوم الموضحة في الجدول بالمللي لترات .

أن كمية البايروفيت الناتجة في ثلاثين دقيقة من (0.1) من مصل الدم هي :

$$\frac{ت - كت}{س - كس} \times (0.4) \text{ ميكرومول}$$

ت = قراءة انبوب الفحص

كت = قراءة كفىء الفحص

س = قراءة المحلول القياسي

كس = قراءة كفىء المحلول القياسي

وعليه فأن البايروفيت التي تنتج خلال دقيقة في لتر من مصل الدم هي :

$$\frac{ت - ك ت}{س - ك س} \times (0.4) \times \frac{(1)}{(30)} \times \frac{(1000)}{(0.1)} = \frac{ت - ك ت}{س - ك س} \times (133) \text{ ميكرومول}$$

يتم تحويل البيروفيت المحسوبة الى وحدات عالمية باستعمال الجدول السابق . ويلاحظ ان اذا كان نشاط أحد الانزيمين أكثر من (60) وحدة عالمية/لتر فعندئذ يجب أعادة الفحص بفترة تحضين قصيرة مع الأخذ ذلك في الاعتبار واجراء التعديل اللازم في الحساب . يجب فصل مصل الدم من النماذج فوراً وفي أقصر وقت والاحتفاظ بالمصل عند درجة (4)مْ لحين اجراء الفحص على النموذج اذا كان في نفس اليوم أو التجميد والحفظ عند (-20)مْ اذا تأجل الفحص لليوم التالي .

المحاليل :

محلول دارىء الفوسفات :

(أس ها (7.4)) اذب (11.3)غرام من ثنائي صوديوم الفوسفات الهيدروجين اللامائية الجافة مع (2.7) غرامات فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين اللامائية الجافة في كمية من الماء المقطر وأكمل الى لتر . تحقق من صحة دقة أ س ها للمحلول مستخدماً مقياس أ س ها الكهربائي أو ورقة كاشف ذات مجال ضيق (indicator strip of narrow range) واحفظ المحلول عند درجة (4)مْ .

مادة الاساس للانزيم (GOT) :

تركيز (α - keto glutarate 2mM; DL-aspartic acid 200 mM) أذب (13.3) غرام من حامض الاسبارتيك في اقل كية من محلول هيدروكسيد الصوديوم واحد عياري حيث ينتج محلول ذو أ س ها (7.4) (حوالي 90 مللي لتر من محلول هيدروكسيد الصوديوم كافية لهذا الغرض) . ثم أضف (0.146) غرام من حامض الفاكيتوكلوتاريك ، واذب باضافة كيات قليلة من محلول هيدروكسيد الصوديوم . ثم أضبط أ س ها لتكون (7.4) تماماً وأكمل الحجم الى 500 مللي لتر مستخدماً محلول دارىء الفوسفات . قسم المحلول الى أجزاء صغيرة من (5-10) مللي لتر وأحفظ في حالة التجمد عند درجة - 15مْ .

قياس البايروفيت المخزون : (تركيز 20 mM) :

(220) مللي غرام من بايروفيت الصوديوم تذاب في محلول الدارىء ويكمل الحجم الى (100) مللي لتر مستخدماً محلول دارىء الفوسفات وتحفظ بحجوم (1) مللي لتر عند درجة (15) مْ .

محلول (4 : 2) ثنائي فينيل هيدرازين :

﴿تركيز (1mM) مللي مول﴾ اذب (19.8) مللي غرام ثنائي نايتروفينايل هيدرازين في (15) مللي لترات من حامض الهيدروكلوريك المركز وأكمل الحجم الى (100) مللي لتر بالماء المقطر . أحفظ بقنينة بنية بدرجة حرارة الغرفة .

محلول البايروفيت : القياسي العامل : ﴿تركيز (4) مللي مول﴾

خفف محلول قياسي البيروفيت المخزون بنسبة (1: 5) باستعمال محلول دارىء الفوسفات ، وأحفظ عند درجة (-15) مْ حضر المحلول طازجاً كل أسبوع .

محلول هيدروكسيد الصوديوم (0.4 عياري) :

أذب (16) غرام من هيدروكسيد الصوديوم النقي في كية من الماء المقطر وأكمل الحجم الى اللتر مستخدماً الماء المقطر .

مادة الاساس للانزيم (GPT) :

﴿تركيز (200) مللي مول الالاينين ، (2) مللي مول الفا حامض كيتوكليوتاريك﴾ .
اذب (9) غرامات من حامض الالانين في (90) مللي لتر من الماء المقطر وذلك مع أضافة

حوالي (2.5) مللي لتر من محلول هيدروكسيد الصوديوم واحد عياري واضبط أ س ها عند (7.4) . أضف (0.146) غرام من حامض الفا - كيتوكلوتاريك واذب باضافة كمية صغيرة من محلول هيدروكسيد الصوديوم ثم أضبط أ س ها مرة أخرى عند (7.4) وأكمل الحجم الى (500) مللي لتر مستخدماً محلول دارىء الفوسفات وقسم الى اجزاء بحجوم (5–10) مللي لتر وأحفظ في حالة التجمد عند درجة (–15)مْ .

الفصل الثامن

الفيتامينات (فيتامين أ - البيتاكاروتين) .

فيتامين (أ) والبيتاكاروتين (Vitamin A and B–carotenes)

يسبب نقص فيتامين (أ) حدوث عدد من الامراض السريرية ومن اهمها العش الليلي (night – blindness) كما قد يسبب جفاف مقلة العين (xerophthalmia) وكذلك التهابات وتلونات جلدية مميزة تجعل الجلد شبيها بجلد الضفدعة ولذا يطلق عليه (toad–dermatitis or phrynoderma) كما انه يؤدي الى التهاب اللثة (gingivitis or pyorrhea) .

وفيتامين (أ) من الفيتامينات التي تذوب في الدهون ويتوقف امتصاص الفيتامين من الامعاء على كفاءة البنكرياس في افراز الانزيم ليپيز (lipase) الهاضم للدهون ومن ثم ففي حالة عدم كفاءة البنكرياس وعدم توفر الانزيم لا تهضم الدهون وبالتالي يقل امتصاص الفيتامين من الامعاء ولذا فان منحنى امتصاص فيتامين (أ) يستخدم كأختبار للوقوف على نشاط البنكرياس في افراز هذا الانزيم . كما ان امتصاص الفيتامين من الامعاء يتأثر في وجود حالات الاسهال وخاصة المصحوبة بفقدان كمية كبيرة من الدهون (steatorrhea) وبذا ينخفض معدله في الدم ويظهر منحنى امتصاص غير طبيعي ولبناء منحنى الامتصاص الفيتامين يؤخذ نموذج من الدم قبل اعطاء الجرعة (350.000 وحدة دولية مذابة في كمية من الزيت) ثم تجمع عينة دم بعد خمس ساعات . فاذا حدث ارتفاع في مستوى الفيتامين في الدم بما يزيد على (500) وحدة دولية / (100)سم٣ من المصل فان هذا يستدل منه على كفاءة هضم وامتصاص الدهون واذا لم يحدث هذا الارتفاع وبقى مستوى الفيتامين ثابتا تقريبا في المصل دل على حدوث اضطراب في هضم وامتصاص الدهون .

واساس طريقة تقدير فيتامين (أ) تبنى على خاصية الفيتامين في امتصاص الضوء بدرجة عالية عند الموجة طول (327 مللي ميكرون) في المنطقة فوق البنفسجية كما ان الفيتامين يتحطم تحت تأثير الاشعة الفوق البنفسجية ولذا فان الفرق بين الكثافة الضوئية وبين النموذج قبل وبعد الاشعاع بالاشعة الفوق البنفسجية يمكن استخدامها في تقدير الفيتامين .

طريقة العمل :

في انبوبة زجاجية ذات غطاء زجاجي سعة (40) مللي لتر امزج (4) مللي لتر من مصل الدم مع (8) مللي لتر من الكحول المطلق (يعمل الكحول على ترسيب البروتينات) ثم اضف (8) مللي لتر من الهبتان (n–heptane) ورج لمدة (15) دقيقة . اترك المحتويات لتستقر ثم افصل طبقة الهبتان والتي تصل الى نصف حجم المصل اذا كان الاستخلاص كاملا . قسم سائل الاستخلاص الى حجمين متساويين وعالجها كما يلي :

أ - **الاختبار** : اقرأ الكثافة الضوئية لاحد النصفين عند (327 mu) مللي ميكرون .

ب - السيطرة :

عرض النصف الاخر من المستخلص لاشعة فوق البنفسجية (مصباح زئبقي mercury lamp) لمدة 3 ساعات لتحطيم الفيتامين . عالج بالمثل محلول قياس لفيتامين (أ) ثم أقرأ الكثافة الضوئية لكلا الانبوبتين عند (327 mu) مللي ميكرون (تؤدي هذين الانبوبتين عمل محلول كفيء لكل من النموذج تحت الفحص ومحلول القياس) .

ج - المحلول القياسي : (يحتوي على (500) وحدة دولية /(100) سم٣ من الهبتان) وتقرأ الكثافة الضوئية عند (327 mu) مللي ميكرون .

في جميع القراءات يصفر الجهاز باستخدام الماء .

احسب تركيز فيتامين أ في النموذج في المعادلة

$$\frac{\text{اختبار - كفيء الاختبار}}{\text{القياسي - كفيء القياسي}} \times (500) \times (2)$$

$$\frac{\text{اختبار - كفيء الاختبار}}{\text{القياسي - كفيء القياسي}} \times (1000) = \text{وحدة دولية من فيتامين أ في (100) مللي لتر مصل الدم}$$

المحاليل :

الهبتان : (n – heptane)

خالي من الهيدروكاربونات الاروماتية (aromatic hydrocarbons)

محلول فيتامين (أ) القياسي المخزون :

يحضر بأذابة (30) مللي غرام من (vitamin A aclohol) وهذا يعادل (= 100.000) وحدة دولية في (10) مللي لتر من الكحول المطلق ثم خفف الى (100) مللي لتر بالهبتان .

محلول فيتامين (أ) القياسي العامل :

(يحتوي على (500) وحدة دولية من الفيتامين/(100) مللي لتر هيبتان ويحضر بتخفيف (0.5) مللي لتر من القياس المخزون الى (100) مللي لتر باستخدام الهبتان .

وهناك طريقة اخرى لتقدير فيتامين (أ) وكذا البتاكاروتين حيث تعتمد طريقة تقدير الاخير على الامتصاص عند الموجة (450) مللي ميكرون في محلول (petroleum ether)

واستنتاج تركيز النموذج بالرجوع الى منحنى قياس للبيتاكاروتين . اما فيتامين (أ) فيتم تقديره تبعاً لطريقة (Carr–Price) والذي يتم فيها تفاعل ثالث كلوريد الانتيمون (antimony trichloride) مع الالكترونات في الاواصر المزدوجة المتبادلة (conjugated double bonds) لينتج لون ازرق تقرأ كثافته الضوئية عند الموجة (620 mu) مللي ميكرون .

النماذج :

تجمع نماذج الدم من المرضى الصائمين ، بحيث تكون خالية من التحلل ولا تعرض للضوء ويحلل النموذج مباشرة او يحفظ عند درجة (-15م) حيث يكون فيتامين (أ) ثابتاً لمدة لاتقل عن اسبوعين .

الطريقة :

1 - بوضع 1 سم^3 من مصل الدم في انبوبة جهاز طرد مركزي ذات غطاء .
2 - يضاف (2)سم^3 من الكحول الاثيلي (95%) ثم يغلق ويمزج جيداً .
3 - يضاف للمزيج (4)سم^3 (40–60) (petroleum ether) يتم استخلاص فيتامين (أ) ، بيتا كاروتين .
4 - توضع الانابيب في (centrifuge) لمدة عشرة دقائق وبسرعة R.P.M. (2500) .
5 - تؤخذ (3)سم من الطبقة العليا (supernatant) وتوضع في (cuvette) جافة ويصفر الجهاز مستخدماً (40–60) (petroleum ether) كمحلول غفل عند طول موجي (450 مللي ميكرون) وتقرأ انبوبة الاختبار عند هذا الطول الموجي لنحصل على القراءة المقابلة لتركيز بيتا كاروتين .
6 - ثم يبخر (petroleum ether) حتى الجفاف عند درجة حرارة (50 C)مْ تحت تيار من النتروجين ويضاف اليها (1.5)سم من الكلوروفورم ، ثم يضاف (1)سم من محلول ثالث كلوريد الانتيمون ويمزج ويقرأ عند طول موجي (620 mμ) خلال دقيقتين مستخدماً انبوبة بها ثالث كلوريد الانتيمون كمحلول غفل.

المحاليل :-

- الكحول الاثيلي (95%)
- (40–60 C) (petroleum ether)
- الكلوروفورم نقي (Analar)
- ثالث كلوريد الانتيمون (analar) .

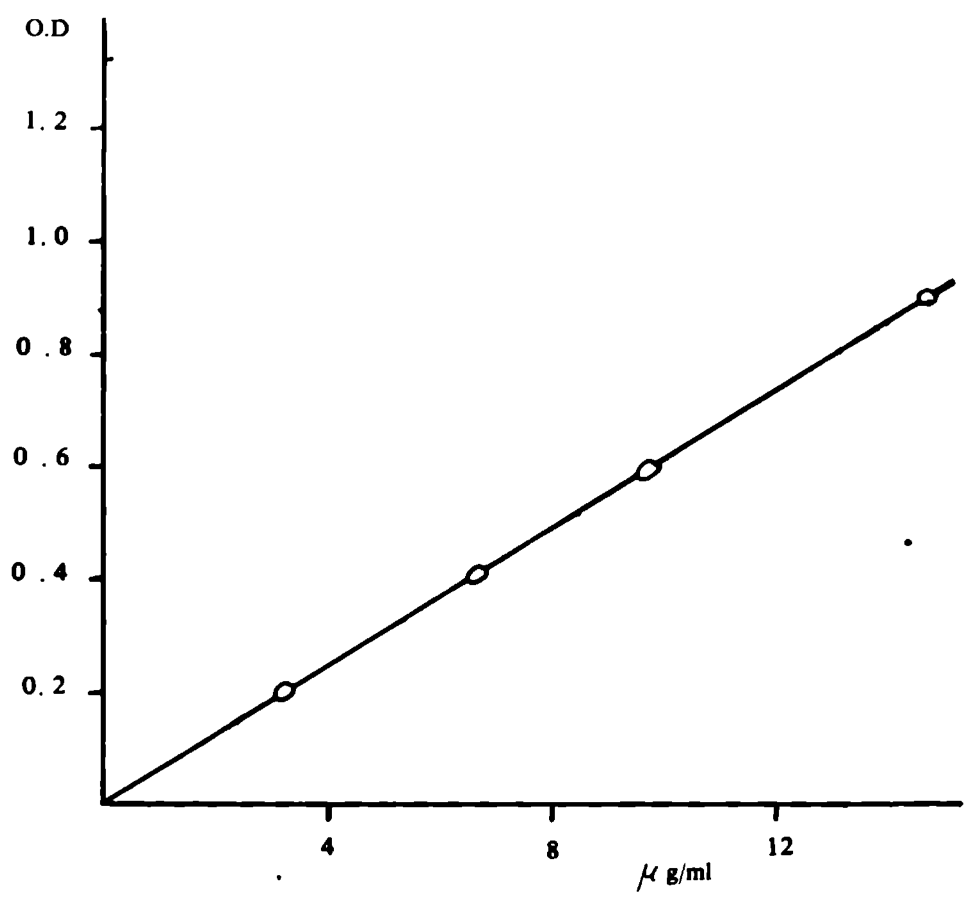
تحضير محلول فيتامين (أ) تركيز (160 µ.g/ml)

- ينقل (16) ملغرام من (all trans-retinyl acetate) الى دورق حجم (100)سم³ ويخفف باضافة (100)سم³ من الكلوروفورم .
- يؤخذ من هذا المحلول القياسي (10, 7.5, 5, 2.5) سم ويوضع كل في دورق حجم (100) سم ويخفف باضافة الكلوروفورم حتى نحصل على التراكيز التالية (4, 8, 12, 16) مايكروغرام/سم ويجب ان يحفظ بعيداً عن الضوء .

وثم ببناء منحني قياسي يستخدم في حساب التراكيز في نماذج الدم وذلك بأخذ (1.5) سم من كل محلول قياسي ويضاف اليه (1) سم³ من محلول ثالث كلوريد الانتيمون وكما جاء في الخطوة (6) اعلاه .

محلول بيتا كاروتين القياسي 200 ميكروغرام / مللي لتر

- توزن (20) ملغرام من بيتاكاروتين وتنقل الى دورق حجم (100) سم³ وتذاب في (4) سم³ من الكلوروفورم ثم يكمل الحجم الى العلامة مستخدماً (petroleum ether) (40–60 C) .
- ومن ثم يؤخذ (10) سم³ من هذا المحلول القياسي الذي تركيزه (200) الى (100) سم³ مستخدماً (petroleum ether (40–60) لكي نحصل على تركيز مقداره (20) مايكروغرام/سم³ ثم يؤخذ من المحلول الاخير حجوم (20, 15, 10, 5, 2.5) سم ويخفف ايضاً الى (100) سم³ (petroleum ether) لكي نحصل على التراكيز (3.0, 2.0, 1.0, 0.5, 4.0) مايكروغرام/سم وهي ثابتة لمدة اربع ساعات تقريباً وفي درجة حرارة (25C)مْ ويجب حفظها بعيداً عن الضوء ويرسم له خط بياني يستخدم في حساب التراكيز في نماذج الدم .



المنحني القياسي لتقدير فيتامين أ في مصل الدم (طول الموجة المستخدمة 620 nm) .

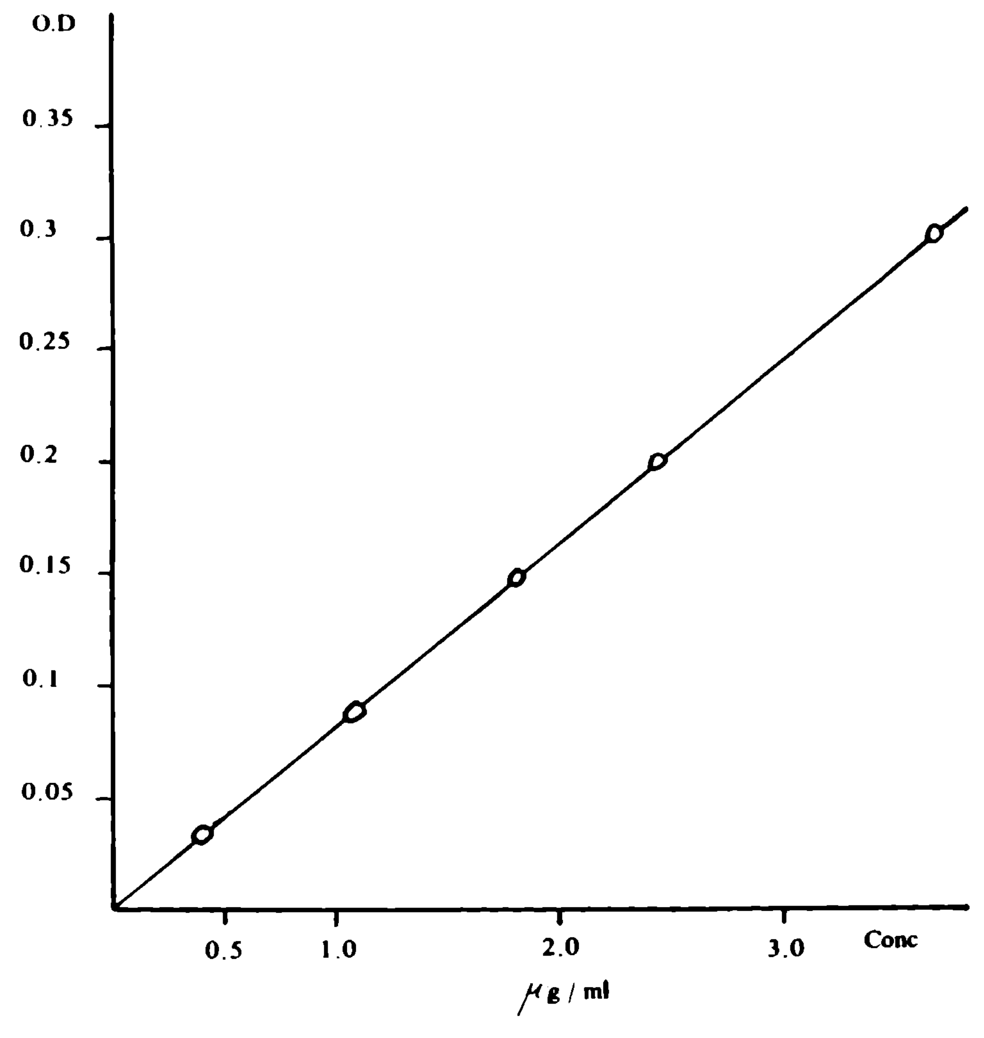
طريقة الحساب :

— اولاً (بيتاكاروتين) ونحصل على القراءة من المقياس البياني الخاص (بيتاكاروتين) .

(μg B– carotene/ 100 mL serum = μg B– carotene/mL × 4.0 × 100)

حيث ان (4) سم هي حجم (petroleum ether) المحتوي على بيتاكاروتين من (1) سم من مصل الدم بعد الاستخلاص (100) = معامل تحويل مايكروغرام/سم الى مايكروغرام/(100) سم .

— ثانياً فيتامين (أ) .



المنحنى القياسي لتقدير البيتاكاروتين في مصل الدم (طول الموجة المستخدمة 450 nm) .

— يجب ان يصحح فيتامين (أ) عن القراءة على طول موجي ضوئي (620 mu) وذلك تبعاً للمعادلة الآتية :-

$A_3 = A_2 - (F \times A_1)$

A_1 = absorbance of carotene at 450 mμ

A_2 = absorbance at 620 mμ due to both carotene and vitamin A

A_3 absorbance at 620 mμ of vitamin A.

$$F = \frac{\text{absorbance of B-carotene at 620 m}\mu}{\text{absorbance of B carotene at 450 m}\mu}$$

F = factor which converts the carotene absorbance at 450 mμ into the equivalent absorbance at 620 mμ into the colour reaction. Therefor, μg vitam A (free alcohol)/100 ml.

$$= \frac{A_3 \times \mu\text{g retinyl acetate standard/cuvette}}{A_{620}\text{retinyl acetate standard}} \times \frac{4}{3} \times 100 \times 0.871$$

4 = volume of the petroleum ether extract of 1.0 serum.

3 = aliqout of the petroleum ether extract used for the estimation of total after evaporation.

0.871 = ratio of molecular mass of retinal to molecular mass of retinyl acetate.

الفصل التاسع

تحليل العصارة المعدية

تحليل عصارة المعدة (Gastric juice analysis)

ان اهم المكونات الرئيسية للعصارة المعدية تنحصر في :-

1 - حامض الهيدروكلوريك والذي يفرز بواسطة الخلايا الجدارية (parietal cells)

2 - البيبسينوجين (pepsinogen) والذي يفرز من الخلايا الرئيسية وهو الصورة الخاملة والغير فعالة للانزيم البيبسينوجين بتحويله الى البيبسين تحت تأثير حامض الهيدروكلوريك والاخير حامض يهيء ايضاً الوسط الحامضي اللازم لفعالية هذا الانزيم في تحلل البروتينات .

3 - رنين هو الانزيم الذي يؤدي نشاطه الى تخثر الحليب وذلك بتحويل البروتين كاسينوجين الى كاسين .

4 - عامل الهيموبويوتيك يعرف بالعامل الداخلي (intrinsic factor) وهو بروتين يسهل من امتصاص فيتامين ب 12 والذي يؤدي نقصه وعدم وجوده الى ظهور مرض فقر الدم من نوع (pernicious anaemia) .

5 - مخاط (mucin) وهو مادة مخاطية تبطن جدران المعدة لوقايتها من تأثير حامض الهيدروكلوريك وكذلك من تأثير الاحتكاك مع محتويات المعدة من الاغذية الصلبة .

وينشط الافراز المعدي استجابة لعدة عوامل منها :- عوامل نفسية (Psychicfactors) وكذلك تحت تأثير الجاستيرين (هرمون يفرز من الغشاء المبطن للمعدة) وكذلك تحت تأثير وجود بعض منتوجات الهضم في الامعاء .

يتم جمع نماذج من العصارة المعدية للتحليل بأستخدام انابيب خاصة يطلق عليها أسم (gastric tubes) ان حجم العصير المعدي في حالة عدم تناول طعام وهدوء المعدة (resting stomach) وبعد صيام ليلي (overnight fast) يتراوح مابين (20–50) مللي لتر في بعض الحالات قد يرتفع الحجم الى معدل غير اعتيادي قد يصل الى (100) مللي لتر نتيجة لأحد الاسباب الآتية -

أ - فرط الافراز (hyper–secretion) :

ب - احتباس المحتويات المعدية (retention of gastric contents) .

جـ - تفريغ معدي بطيء او متأخر (delayed gastric emptying) .

د - او الى استرجاع بعض محتويات الإثني عشري .

غالباً مايلاحظ زيادة حجم العصارة المعدية عند المرضى المصابون بقرحة الاثني عشري (duodenal ulcer) ان حمضية العصارة المعدية يمكن قياسها بطريقة مباشرة وباستخدام جهاز

قياس أ س ها أو بالمعادلة والتسحيح باستخدام محلول قلوي . ويمكن استخدام كاشف الفينولفتالين في عملية التسحيح ويطلق على القيمة التي نحصل عليها بالتسحيح اسم الحمضية الكلية (total acidit) وهذه الحمضية الكلية تتكون من جزئين : حمضية حرة (free acidity) وحمضية متحدة او مرتبط (combined acidity) . والحمضية الحرة تقابل كمية القلوي التي تلزم عند تسحيح العصارة المعدية مع استخدام كاشف (Topfer reagent) وهو كاشف يتغير لونه من الاحمر الى البرتقالي عند أ س ها (3.5) . أما الحمضية المرتبطة فهي كمية القلوي التي تلزم التسحيح الباقي من الحامض باستخدام كاشف الفينولفتالين وحتى أ س ها (8.5) .

هناك طريقة اخرى لمعرفة كمية الحامض في العصارة المعدية وهو مايعرف بالتحليل المعدي اللاأنبوبي حيث تعطى مادة عن طريق الفم والتي يتوقف امتصاصه بالامعاء على كمية حامض الهيدروكلوريك المتوفرة في العصارة المعدية ، ثم تطرح المادة الممتصة من الدم الى البول عن طريق الكلية وبذا فأن كمية المادة التي توجد في البول يكافيء كمية الحامض في العصارة المعدية . أحد هذه المواد هي (diagnex blue) وهو معلق من خرزات (beads) من راتنج آيوني تبادلي (ion–exchange resin) تربط ايوناتها الصبغة الزرقاء (Azure–A) (اي ان كمية الصبغة الزرقاء المتحررة تتوقف على كمية الحامض في العصارة المعدية) والجزء المتحرر من الصبغة هو الذي يمتص الى الدورة الدموية ومنها يطرح بالبول ويقدر تركيزه باستخدام الجهاز الضوئي الطيفي . ومن الضروري الاشارة الى ان جزء من الصبغة قد لايطرح بالبول بصورته الزرقاء والتي يمكن تحويلها الى هذه الصورة باضافة كمية قليلة من الحامض للبول وملح نحاس

الطرق المباشرة لتحليل العصارة المعدية :

يطلب من المريض الصيام طوال الليلة التي تسبق التحليل وفي الصباح يجمع نموذج من العصارة المعدية (نموذج السيطرة control sample ثم يعطى المريض محفز لافراز العصارة المعدية مثل (Histalog) (والذي يعرف ايضاً بأسم etazole) أو يعطي كمية من الهرمون جاسترين . ثم تجمع نماذج من العصارة المعدية على فترات وتحلل النماذج السيطرة والتي جمعت بعد التحفز بالتسحيح لمحلول هيدروكسيد الصوديوم او تقاس أ س ها للنماذج بأستخدام جهاز قياس أ س ها ان اعطاء مركب الهستامين يساعد على معرفة استجابة وسرعة المعدة لافراز آيونات الهيدروجين ويمكن الوصول بالتحفيز الى درجة عالية (maximal response) باعطاء جرعة كبيرة من الهستامين مع اعطاء مادة مضادة للهستامين (anti–histamine) والتي يمكنها ايقاف وابطال مفعول الهستامين الجانبية (side–effect) ولكنها لاتؤثر على مفعول الهستامين في تحضير المعدة لافراز آيونات الهيدروجين في الاشخاص الطبيعين تبلغ كمية الحامض في نموذج

السيطرة من (0–10) مللي مكافىء/ الساعة وتبلغ الحد الاقصى الذي لايزيد عن (35) مللي مكافىء/الساعة تحت تأثير الهستامين وهي عند الرجال غالبا اعلى منها عند النساء . وفي حالات قرحة الاثنى عشر قد لاتختلف كثيراً كمية الحامض في نموذج السيطرة ولكن يظهر اختلاف كبير في الحضية العضوية بعد التحفيز بالهستامين واذا زادت الحضية العضوية عن (35) مللي مكافىء/الساعة عند الرجال ، عن (15) مللي مكافىء/الساعة عند النساء فأن هذا قد يشير الى احتمال وجود قرحة الاثنى عشر ، وان القيمة اذا قلت عن (11) مللي مكافىء/الساعة فأن هذا ينفي وجود قرحة الاثنى عشر .

ملاحظات :

(1) يمكن التعبير عن حمضية العصارة المعدية بوحدات مللي مكافىء/اللتر ، تبلغ الحضية الكلية في حدود (10–50) مللي مكافىء/اللتر وتزداد ملحوظة بعد اعطاء المحفز الهستامين او هرمون الجاسترين .

(2) كما وان أ س ها للعصارة المعدية تقع اعتيادياً بين (1.5–4) . يخفض المحفز في الاشخاص الاصحاء الى (2) او اقل . ولكن عند عدم وجود حامض الهيدروكلوريك في العصارة المعدية فأن أ س ها تكون غالباً أعلى من (7) .

(3) ان عدم وجود حامض الهيدروكلوريك في العصارة المعدية (achlorhydria) او الانخفاض الشديد في عينه (hopo–chlorhydria) مؤشر قوي لتشخيص فقر الدم الخبيث (pernicious anaemia) او السرطان المعدي (gastric cancer) .

(4) ان وجود كمية كبيرة من حامض الهيدروكلوريك (hyper–chlorhydria) في العصارة المعدية قبل التحفيز هو مؤشر قوي لوجود قرحة معدية (gastric ulcer) وبعد التحفيز هو مؤشر قوي لوجود قرحة الاثنى عشرة .

خطوات العمل اختبار الهستامين : (Histamine test meal)

- يطلب من المريض الصيام طوال الليل السابقة ليوم اجراء التحليل .
- في الصباح الباكر تدخل انبوبة معدية وتفرغ محتويات المعدة بالكامل .
- يتم جمع العصارة المعدية بعد ذلك على مدى ساعة حيث تفرغ المعدة كل (5–10) دقائق بالسحب باستخدام حقنة (syringe) .
- بعد (40) دقيقة من بدء ساعة السحب يعطى المريض (100) مللي غرام من مادة (Anthisan) بالحقن في العضل (intramuscular) وعند نهاية الساعة يعطى المريض

(0.04) مللي غرام من الهستـامين فوسفـات (histamine acid phosphate) لكل كيلـوغرام من وزن الجسم بـالحقن تحت الجلـد (subcutaneous) يستمر جمع العصـارة المعـديـة لسـاعـة اخرى بعد الهستـامين حيث تفرغ المعـدة (5–10) دقـائق وترسل جميع النماذج للساعة الاولى والسـاعة الثانية بالكامل الى المختبر للتحليل .

التحليل :

يقاس حجم نموذج كل ساعة بدقة ويلاحظ جيداً لوجود دم او ايـة بقـايـا فيـه ثم يعـادل نموذج كل ساعة بالتسحيح بمحلول قلوي قياسي وحتى أ س ها (7–7.4) وذلك كما يلي :-

- توضع (5) مللي لتر من العصارة المعدية في قارورة ويضـاف لهـا (2) نقطـة من كاشف برومو الثيمول الازرق (bromothymol blue) ، ان ظهور لون ازرق يدل على عـدم وجود حـامض الهيدروكلوريك . اذا ظهر لون أصفر يسحح بمحلول هيدروكسيـد الصوديوم (0.05) عيـاري (50 مللي مكافىء/اللتر) وحتى نقطـة النهـايـة (يستـدل عليهـا بظهـور لـون ازرق – مخضر (blue–green) .

الحساب :

الحمضية المعدية = حجم محلول التسحيح × $\frac{50}{5}$
(مللي مكافىء/لتر)

= حجم محلول التسحيح × (10)

سرعة انتاج حامض المعدة = حجم محلول التسحيح × (10) × $\frac{\text{حجم بالمللي لتر}}{(1000)}$

= مللي مكافىء / الساعة .

المحاليل :

1 – الكاشف : يذاب (400) مللي غرام من بروموثيمول الازرق في (50) مللي لتر كحول .
2 – محلول هيدروكسيد الصوديوم (0.05) عياري ويحضر بأذابة (2.2) غرام من هيـدروكسيـد الصوديوم النقي في كيـة من المـاء ويكمـل الحجم الى اللتر . ثم تعرف عيـاريتـه بـالضبـط بـالمعـايرة بمحلول حـامض قيـاسي ثم نخفف المحلول حسب المعـامل (factor) للحصول على محلول هيدروكسيد الصوديوم (0.05) عياري بالضبط .

خطوات العمل لتقدير الحامض الحر والحامض المرتبط بالعصارة المعدية :

حول بماصة (1.0) مللي لتر من العصارة المعدية بعد ترشيحها الى دورق او قارورة مخروطية صغيرة وأضف (3-2) مللي لتر من المـاء المقطر ثم أضف (3-2) قطرات من كاشف توبفر المحور مع الفينولفتالين (Topfer's reagent with phenolephthalein) سيظهر لون ارجواني عند وجود حامض الهيدروكلوريك الحر . عاير بمحلول هيدروكسيد الصوديوم (0.1) عياري واستمر في الاضافة وحتى اختفاء اي أثر للون الارجواني ونشوء لون أخضر واقرأ السحاحة وسجل حجم القاعدة التي تمت اضافتها والتي عادلت الحامضية الحرة . استمر في المعايرة ولحين اختفاء اللون الاخضر وعودة ظهور اللون الارجواني ثانية . أقرأ السحاحة وتعبر هذه القراءة عن الحجم الكلي للقاعدة التي تعاير الحضية الكلية في العصير المعدي .

ان الفرق بين القراءة عندما كان اللون اخضر والحجم الكلي عند عودة اللون الارجواني فهو يمثل الحضية المرتبطة (combined acidity) ويعبر عن النتائج بالمللي لترات لحامض الهيدروكلوريك (0.1) عياري لكل (100) مللي لتر من محتويات المعدية وهذه تساوي ايضاً مللي مكافىء/لتر والتي يفضل استخدامها حالياً .

اختبار كونز بيرج (Gunsburg test) لحامض الهيدروكلوريك الحر :

أخلط (1-2) قطرة من المحتويات المعدية مع (1-2 قطرة من كاشف (Gunsburg) في جفنة صغيرة وبخر حتى الجفاف على حمام مائي يغلي في حالة وجود حامض الهيدروكلوريك الحر يظهر لون احمر حيث ان هذا الاختبار يعطي نتائج ايجابية مع الحوامض المعدنية فقط وليس مع الحوامض العضوية فانه يدل على وجود حامض الهيدروكلوريك الحر حيث انه هو الحامض المعدني الوحيد الممكن ان يوجد في العصارة المعدية .

اختبار للكشف على حامض اللاكتيك في العصارة المعدية :

ضع (2) مللي لترات من المحتويات المعدية بعد ترشيحها في انبوب اختبار ثم أضف (1-2) قطرة من محلول كلوريد الحديديك (10%) يظهر لون أصفر في حالة وجود حامض اللاكتيك . املاء الانبوب بالكامل تقريباً بالماء المقطر واخلط بالقلب يستمر تواجد اللون الاصفر والعائد الى وجود حامض اللاكتيك .

وكطريقة بديلة ضع ثلاث نقاط من كلوريد الحديديك (10%) في انبوب اختبار واملاها وحتى مايقرب من ثلاثة ارباعها بالماء المقطر . اخلط جيداً ثم أضف (1-2) مللي لترات من محتويات المعدة بعد ترشيحها فأن وجود حامض اللاكتيك يؤدي الى ظهور لون أصفر . أن

وجود حامض اللاكتيك في عصارة المعدة بعد صيام طوال الليل يشير الى وجود سرطان معدي (يجب التأكد من عدم وجود سوء هضم وتخمر للطعام بالمعدة (indigestion and fermentation) حيث ان هذا يؤدي الى زيادة كمية حامض اللاكتيك - ولذا يجب ان تكون المعدة خالية عند اجراء هذا الاختبار لغرض تشخيص السرطان المعدي) .

يبدأ اجراء الاختبار في الصباح الباكر بعد حوالي عشرة ساعات صيام اثناء الليل بدون طعام او شراب وتتلخص الخطوات فيما يلي :-

1 - يتم جمع المحتويات المعدة الراكدة .
2 - ثم يعطى الشخص طحين الشوفان (ملعقتين شاي مملوء من طحين الشوفان في حوالي (600) مللي لتر من الماء ومرشح بقماش الموسلين (muslin) .
3 - يتم سحب حوالي (10) مللي لترات من المحتويات المعدية كل (15) دقيقة وحتى (2.5) ساعة (في بعض الاحيان يتم افراغ المعدة قبل هذا الوقت) .

في الحالات الاعتيادية تظهر الحامضية الحرة في المحتويات المعدية بعد حوالي نصف ساعة وبعد ذلك يرتفع الحامض الحر ليصل الى اعلى قيمة بعد حوالي ($\frac{1}{4}$ - $1\frac{1}{2}$) ساعة من اعطاء الوجبة وبعدها يبدأ تركيز الحامض الحر في الانخفاض وتتراوح القيمة العظمى للحامض الحر من (15–45) مللي مكافىء/لتر . أما الحمضية الكلية فهي تزيد عن ذلك بحوالي (10) مللي مكافىء/لتر .

اختبار الوجبات مع الانسولين (Insulin test meal) :-

يستخدم هذا الاختبار للتأكد من نجاح العملية الجراحية لقطع العصب الحائر عن المعدة والتي اجراؤها كجزء من علاج قرحة الاثني عشري .

وهناك أدلة قوية تشير الى ان زيادة عصارة المعدة التي تتبع حقن كمية من الانسولين انما يرجع الى تنبيه مركزي للعصب الحائر نتيجة لحدوث انخفاض في مستوى السكر بالدم (hypoglycaemia) .

المحاليل :

1 - محلول هيدروكسيد الصوديوم (1.0) عياري :

اذب (4.2) غرام هيدروكسيد الصوديوم في لتر واحد من الماء المقطر وتأكد من عياريته بتسحيحه مع حامض قياسي واضبط العيارية بالتخفيف المناسب .

2 - محلول توبفر المحور مع الفينولفثالين :-

أذب (0.5) غرام من داي مثيل امينو بنزين (dimethylaminobenzene) و (1) غرام من

الفينوفثالين في (100) مللي لتر من الكحول الاثيل (95%) ثم اضف قليل من صبغة المثيلين الازرق وأمزج جيداً بالرج .

3 - محلول كوزنبيرغ (Guesnburg reagent) :

اذب (2) غرام من فلوروكلوسينول (fluoroglucinol) مع (1) غرام من الفانيلين (vanilin) في (100) مللي لتر من كحول الاثيل (95%) ويحضر طازجاً عند الحاجة .

خطوات العمل للتسحيح مستخدماً كاشف الفينولفتالين :

1) اذا كانت العصارة المعدية تحتوي على بقايا طعام فيجب ترشيحها من خلال عدة طبقات من القطن او الزجاج الصوفي (glass wool) .

2) تقاس (10) مللي لتر من العصارة المعدية في جفنة من الخزف ويضاف اليها (10) مللي لتر من الماء المقطر وتمزج جيداً .

3) تضاف (3) نقط من محلول الفينولفتالين ويسحح باستخدام محلول هيدروكسيد الصوديوم (0.1) عياري وحتى ظهور أول أثر للون الوردي .

الحساب :

كمية الحامض الكلية مللي مكافيء/اللتر = حجم محلول التسحيح × (10)

المحاليل :

1 - محلول الفينولفتالين : يذاب (1) غرام من الفينولفتالين في (100) مللي لتر من الكحول تركيز (95%) .

2 - محلول هيدروكسيد الصوديوم (0.1) عياري : تذاب (4.4) غرام من هيدروكسيد الصوديوم النقي في كمية من الماء ويكمل الحجم الى اللتر . ثم تعرف عياريته بالضبط بالمعايرة بمحلول حامض قياسي ثم يخفف المحلول حسب المعامل (factor) للحصول على محلول هيدروكسيد الصوديوم (0.1) عياري بالضبط .

تحليل العصارة المعدية اللاأنبوبي :

ان اختبار(diagnex blue)مفيداً جداً للكشف على الحالات التي لا يوجد عندها حامض هيدروكلوريك في العصارة المعدية . انه اختبار سهل ولا يتطلب وضع الانبوب المعدي والذي يضايق المريض كثيراً وقد يؤدي الاضطراب النفس والقلق الناتج من استخدامه الى تغيير في المكونات الحامضية بالعصارة المعدية . وكما سبق القول فأن الاختبار يعتمد على تحرر (Azure-A) تحت تأثير آيونات الهيدروجين الموجود بالعصارة المعدية وامتصاصها الى الدم ثم

طرحها بالبول ، وفي غياب حامض الهيدروكلوريك المعدي لاتتحرر هذه الصبغة الزرقاء ولا تظهر بالبول . ويتكون العقار المستخدم من قرصين : احدهما يحتوي على (250) مللي غرام من صوديوم بنزوات الكافين (caffein sodium benzoate) والآخر يحتوي على (2) غرام من الراتنج المحمل بالصبغة . ويطلب من المريض الصيام طوال الليل وفي الصباح يعطي قرص الكافين وبعد ساعة تفرغ المثانة (ويهمل نموذج الادرار) ثم يعطى المريض قرص الراتنج المحمل بالصبغة مع كوب من الماء ثم يجمع جميع البول المطروح خلال الساعتين التاليتين لتناول القرص يتم بعد ذلك تخفيف البول وتقرأ الكثافة : يحضر نموذج السيطرة (control) بأضافة حامض الاسكوربيك الى كمية من البول حيث تختزل الصبغة الى مركب عديم اللون .

ان ايجابية الاختبار تدل على وجود حامض الهيدروكلوريك بالعصارة المعدية والاختبار دقيق وليس هناك احتمال لحدوث نتيجة موجبة مزيف (flase–positive) . واذا كان الاختبار سلبي فهو يشير الى احتمال عدم وجود حامض الهيدروكلوريك والذي يجب ان يجري تأكيده باختبار وجبة الهستامين السابق شرحه .

مقارنة بين التحليل المباشر مع التحليل اللاأنبوبي للعصارة المعدية :

تتلخص مميزات التحليل المباشر في :-

1) يعطي نتيجة كمية مباشرة .

2) يمكن الحصول على المتغيرات في وظيفة المعدة على انتاج العصارة مع الوقت بعد اعطاء المحفز .

ومن عيوب طريقة التحليل المباشر :-

1 - عدم راحة المريض بادخال الانبوب .

2 - صعوبة الحصول على نموذج نقي من العصارة المعدية بدون ان يكون ملوثاً ومختلطاً مع اللعاب او محتويات الاثنى عشر .

مميزات الطريقة اللاانبوبية (الغير مباشرة) :-

1 - راحة المريض وعدم حدوث قلق أو أثارة نفسية عند أجراء الاختبار .

عيوب الطريقة اللاأنبوبة :

1 - أن النتائج نوعية فقط (qualitative) وليست كمية .

2 - تتوقف النتائج على تمتع الفرد بوظائف طبيعية لكل من الامعاء والكلية والجهاز البولي .

3 - تستغرق الطريقة وقتاً طويلاً نسبياً .

4 - قد لايستطيع المريض تناول كل الجرعة او قد لايمكن جمع كل البول الناتج خلال الساعتين وكلاهما يؤديان الى نتائج غير صحيحة .

الفصل العاشر

اجهزة التحليل الذاتي في الكيمياء السريرية .

تحليل البول (Urine analysis)

1) الكشف على الالبيومين في البول : (Detection of albumin in urine)

أ - باستخدام حامض الخليك المائي تركيز (5%)

طريقة العمل : رشح كمية من البول تحت الفحص في انبوبة اختبار ذات جدران رقيقة .

سخن الجزء العلوي {حوالي (2)سم3} من محتويات الانبوبة مستخدماً لهب بنزن (Bunzen burner) ولاحظ وجود عكارة (turbidity) او ترسيب (precipitation) اضف (2-3) قطرات من محلول 1% من حامض الخليك ثم أعد التسخين . أن اختفاء العكارة او الترسيب يشير الى ان الراسب المتكون يرجع الى وجود املاح وان عدم اختفائه يشير الى احتواء البول على البروتينات . ويجب ان نشير هنا الى انه عندما تكون الكثافة النوعية للبول منخفضة فقد يدخل الميوسين (mucin) والبروتينات النووية للاختبار ولمنع هذا التداخل يضاف الى البول المرشح نصف حجمه من محلول كلوريد الصوديوم المشبع وحوالي (5) قطرات من حامض الخليك الثلجي ويجري الفحص كما ورد اعلاه (ملوحظة : يساعد ملح كلوريد الصوديوم على بقاء البروتينات النووية في المحلول ويذيب حامض الخليك الجليدي الميوسين وبذا لايتدخلا في التفاعل عند الكشف على وجود الالبيومين او الجلوبيولينات في البول .

ومن جهة اخرى فأن تعديل (adjusting) أسها للبول قبل الفحص يمكن تجنب الصعوبات التي تنشأ من ترسيب الفوسفات . كما أنه قد يحصل المحلل على نتائج غير صحيحة وكاذبة (false) اذا كان البول قلوي او حامض بدرجة كبيرة حيث ان البروتينات لاتتخثر اذا تم تسخين محاليلها عند أسها قريب من نقطة التشابه الكهربائي (isoelectric point) .

ب - باستخدام الشريط الكاشف (Indicator strip' Albstix')

يحمل الشريط الكاشف مؤشر (indicator) ومنظم (buffer) ويتم غمس (dip) الشريط في البول ويرفع بسرعة ثم يقرأ . عندما يكون الاختبار سالب (negative) يظل الشريط اصفر . والبول الذي يحتوي على (10) مللي غرام/100 مللي لتر تظهر لون اخضر باهت (pale-green) . في حين ان اللون يصبح اخضر - مزرق (blue-green) او ازرق (blue) مع زيادة تركيز البروتينات ومن الضروري الاشارة الى ان تلوث البول او أسها القلوي الشديد قد تتغلب على قدرة الدرء (buffering) للشريط ومن ثم تؤدي الى نتائج موجبة كاذبة (false-positive results) .

جـ - باستخدام حامض سلفوساليسيلك(Sulphosalysilic acid)

المحلول : كبريتات الصوديوم $Na_2SO_4.10H_2O$ 20 غرام
حامض سلفوساليسيلك 5 غرام
ماء مقطر 1000 مللي لتر

الاجراء : الى حجم واحد من البول اضف حجم مساوي من الكاشف .
سخن الخليط بهدوء ولا يسمح بالغليان . ان ظهور عكارة او رواسب على البارد او بعد التسخين الهادىء يدل على وجود الاح .

د - الكشف عن بروتين بنس جون (bence john protein)

أو اختبار (Osgood and Hasking)
الكاشف : 1 - المحلول المائي لحامض الخليك 5% .
2 - المحلول المائي المشبع لكلوريد الصوديوم .

الاجراء : اضف حجم واحد من الكاشف الى 5 أحجام من البول ويسخن الانبوب حيث يلاحظ تكون راسب في درجة حرارة 55–60م ويختفي الراسب عند الغليان ويعود بالظهور عند التبريد الى درجة 55–60 درجة مئوية .

هـ - تعيين الاح في البول :

كاشف اسباخ (Esbach)
حامض البكريك (pricric asid) 10
حامض الستريك (citric acid) 20 غرام
ماء مقطر 100 مللي لتر

الاجراء : رشح البول تحت الاختبار ، حمض اذا كان ضرورياً باستعمال حامض الخليك تركيز 35% واملأ انبوبة اسباخ حتى العلامة (U) (for–urine) اضف الكاشف الى العلامة (R) (for–reagent) . اغلق الانبوب بسداد مطاطي . أقلب الانبوب بهدوء عدة مرات ودعها لتستقر لمدة 24 ساعة بحرارة الغرفة . اقرأ مدى ارتفاع الراسب (high of precipitate) الاصفر المتكون لوجود الاح واقسم القراءة على عشرة للحصول على النسبة المئوية للتركيز . من المستحسن تثبيت الكثافة النوعية للبول بأقل من (1.000) بالتخفيف بالماء وبعدها يجري التصحيح الضروري للقراءة .

2 - الكشف وتقدير للسكريات في البول :

أ - كاشف بنيدكت النوعي (Qualitative Benedict Reagent)

بلورات كبريتات النحاس المائية $CuSO_4 . 5H_2O$ (17.3) غرام

كاربونات الصوديوم الجافة (Na_2CO_3) (100) غرام

استرات الصوديوم المائية $Na_3C_6H_5O_7 . 2H_2O$ (173) غرام

ماء مقطر حتى (1000) مللتر .

طريقة العمل : ضع (5)سم3 من الكاشف في انبوبة اختبار ثم أضف (8) قطرات من البول وضع الانبوب في حمام ماء يغلي لمدة خمسة دقائق ارفع الانبوبة واتركها لتبرد ببطء ثم أقرأ عندما يكون الانبوب بارداً تماماً وطبقاً للقواعد التالية :-

أ - ظهور بريق أخضر بدون حدوث راسب يدل على وجود السكر بتركيز في حدود (0.1%)

ب - ظهور بريق اخضر مع حدوث راسب مصفر قليل يدل على وجود السكر بتركيز في حدود (0.2%) .

جـ - ظهور راسب برتقالي مع بقاء السائل ازرق عند الاستقرار يدل على وجود السكر بتركيز في حدود (0.5%)

د - ظهور راسب أحمر برتقالي اللون والسائل الرائق يحتفظ بلون أزرق خفيف عند الاستقرار يدل على وجود السكر بتركيز في حدود (1.0%)

هـ - ظهور راسب كثيف أحمر ناصع اللون مع وجود آثار لون أزرق بالمحلول الرائق عند الاستقرار يدل على وجود تركيز في حدود (2.0%)

التقدير الكمي للسكر المختزل

كاشف بنيدكت (Benedict) الكمي

بلورات كبريتات النحاس المائية ($CuSO_4 . 5H_2O$) (18) غرام

كاربونات الصوديوم الجاف (Na_2CO_3) (100) غرام

سترات الصوديوم ($Na_3C_6H_5O_7 . 2H_2O$) (200) غرام

ثايوسيانات البوتاسيوم (KCNS) (125) غرام

فيروسيانات البوتاسيوم $K_4Fe(CN)_6 . 3H_2O$

محلول (5%) 5 مللي لتر .

ماء مقطر حتى (1000) مللتر .

طريقة العمل : خذ 5 مللي لتر من الكاشف واضف له 4 غرامات من كاربونات الصودي
اللامائية في صحن خزفي (Porcelain dish) واغلي وعاير الخليط وهو يغلي مع البول والح
تكون راسب ابيض واختفاء اللون الازرق .

الحساب : كل واحد مللي لتر من بنيدكت الكمي = (2) مللي غرام كلوكوز .

3 - الكشف على الاجسام الكيتونية :

الكاشف

1 - كبريتات الامونيوم
2 - نايتروبروسايد الصوديوم
3 - امونيا (الكثافة النوعية 0.88)

طريقة العمل : شبع (5) مللي لترات من البول بكبريتات الامونيوم ثم اضف بلورة صغيرة مر
نيتروبروسايد الصوديوم وأخلط جيداً ثم أضف بعناية الى (2) مللي لترمن محلول النوشادر بحيث
تستقر على سطح الخليط . أن ظهور حلقة لها لون البرمنجنات تدل على وجود الاجسا
الكيتونية (الاسيتون acetone) او حامض خلات الخليك (acetoacetate) .

4 - الكشف على وجود حامض خلات الخليك

(اختبار Grehardt)
كلوريد الحديديك (10) غرامات
ماء مقطر (100) مللي لتر

طريقة العمل :- اضف الكاشف قطرة قطرة الى (5) مللي لتر من البول في انبوبة اختبار
ومن ثم ترسب الفوسفات بالكامل .
رشح واضف كمية قليلة من الكاشف الى الراشح .

ان ظهور لون أحمر فاتح والذي يخفض عند الغليان يعني وجود حامض خلات الخليك بتركيز
(0.07%) او أكثر قد يتم الحصول على تفاعلات ايجابية كاذبة (flase–positive results) عند
وجود المركبات الفينولية (phenolic compounds) .

ملاحظة هامة : اوضح (king) بأن هذا الاختبار حساس لتركيز يعادل جزء من حامض
خلات الخليك الى (7000) جزء بول .

الكشف عن الدم الخفى (occult blood)

الكواشف :

1 - بنزيدين (Benzidine)

2 - حامض الخليك (Glacial acetic acid)

3 - برهايدرول (فوق اوكسيد الهايدروجين تركيز (3%) حجم

طريقة العمل :

كية قليلة الكاشف (benzidine) على بلاطة (tile) بيضاء اضف قطرتين من حامض الخليك الثلجي ثم قطرة واحدة من البول ثم قطرة من فوق لوكسيد الهيدروجين واخلط . وان ظهور اللون الازرق يدل على وجود دم بالنموذج .

6 - الكشف عن حامض بيتا - هيدروكسي بيوتيريك

الكاشف :

1 - فوق اوكسيد الهيدروجين (3%)

2 - حامض الخليك .

3 - نايتروبرسيد الصوديوم (1) غرام مذاب في (10) مللي لتر من الماء المقطر .

4 - امونيا (الكثافة النوعية (0.88) .

طريقة العمل : الى حجم واحد من البول (حمض النموذج اذا كان ذلك ضروريا بحامض الخليك) اضف حجماً مساوياً من الماء وسخن للغليان وبخر ليصل الحجم الى نصف الحجم الاصلي بهذا تكون قد طردت الاسيتون وحامض خلات الخليك قسم جزىء المحلول الى قسمين . اضف الى جزء منه (1) مللي لتر من فوق اوكسيد الهيدروجين وسخن بهدوء وبرد ثم اضف 5 قطرات من كل حامض الخليك الثلجي ومحلول نتروبروسيد الصوديوم واخلط جيداً .

بعدها غطي الخليط بعناية بحوالي (2) مللي لتر من محلول النوشادر . أن ظهور حلقة ارجوانية تعني وجود حامض البيتا هيدروكسي بيوتيريك .

7 - الكشف على البيليروبين ومشتقاته في الادرار

أن الصفراء التي تفرزهـا الكبـد ، تحتـوي على مـواد ذات لـون أصفر مخضر تسمى بالبيليروبين (الصبغة الصفراء) وفي أمراض اليرقان وبعض أنواع فقر الدم وبعض الحالات الخمجية يمكن أن تمر أصبـاغ الصفراء الى مجرى الـدم ثم تفرغ في البـول ويمكن الكشف على وجـود البيليروبين ومشتقاته في البول بعدة طرق مختلفة :-

طريقة لوغول : عندمـا يضـاف اليود الى الادرار المحتوى على الاصبـاغ الصفراء . يظهر لون أخضر

أ - يسكب في أنبوب الاختبار (4) مللي لتر من الادرار

ب - تضاف اليها (4) قطرات من محلول لوغول .

جـ - يرج الانبوب جيداً ويلاحـظ اللون الـذي يظهر في الحـال أذا تحول اللون الى لون أسمر مصفر خفيف فأن النتيجة سالبة . أما اذا تحول اللون الى أخضر فـأن النتيجـة موجبة .

المحاليل :- يود (١)غم

يوديد البوتاسيوم (KI) (2) غم

ماء مقطر 100 مللي لتر

٢ - طريقة فوشيت (Fouchet's test)

يمزج في أنبوب الاختبـار (5) مللي لتر من الادرار (2.5) مللي لتر من محلـول كلوريد البـاريوم فيتكون راسب يرشح المزيج ويبقى الراسب على ورقـة الترشيح ثم ينقـط على الراسب فوق ورقـة الترشيح قطرتـان من كاشف فوشيت ففي حـالـة وجود أصبـاغ الصفراء يتحـول لون الراسـب الى لـون أخضر وعنـد غيـاب أصبـاغ الصفراء لايتغير لون الراسب .

المحاليل :-

1 - محلول مائي لكوريـد البـاريوم (10%) : زن (10)غم من كلـوريـد البـاريـوم ($BaCl_2$) وأذب في حجم صغير من الماء ثم وأكمله بالماء المقطر الى (100) مللي لتر .

2 - محلول فوشيت :-

أ - محلول (10%) من كلوريد الحديديك وتحضر بأذابة 10 غم من الملح في المـاء المقطر

وضبط الحجم الى 100 مللي لتر بالماء المقطر .
ب - تحضير الكاشف

محلول كلوريد الحديديك (10%)
أمزج (10) مللي لتر و (25)غم حامض ثلاثي الكلور الخليك (Ccl2COOH) ويكمل الحجم الى (100) مللي لتر بالماء المقطر .

يروبيلينوجين في الادرار
Urobilinogen

طريقة أرليخ :

أضف (5) مللي لتر من الادرار الطازج الى أنبوب أختبار ثم أضف (5) مللي لتر من محلول أرليخ وبعد عشرة دقائق أضف (15) مللي لتر خلات الصوديوم المشبع ولاحظ اللون الناتج :-

لون أحمر قاني :- يدل على وجود كمية كبيرة من اليروبيلينوجين في الادرار .
لون وردي خفيف أو أسمر يدل على ان اليروبيلينوجين موجود بمقادير طبيعية .

ملاحظة :-

يجب أجراء التحليل على نموذج طازج حيث اذا ترك الادرار مدة من الزمن فأن اليربيلينوجين يتأكسد الى اليروبيلين .

المحاليل :

محلول أرليخ : أذب (0.7) غم من (p-dimethminobenzaldehyde) في خليط من (150) مللي لتر حامض الهيدروكلوريك المركز و (100) مللي لتر ماء مقطر .
خلات الصوديوم المشبع :- أذب (100) غم من خلال الصوديوم في (100) مللي لتر ماء مقطر .

تحليل الحصى (Analysis of calculi)

التحليل النوعي للحصى : (Qualitative calculi analysis)

معلومات عامة :

الحصى قد تتكون في انابيب اللعاب او في المجاري البولية او في مجاري الصفراء وحصى مجاري الصفراء قد تحتوي على الكالسيوم ولكنها تتكون عادة من ترسيب مادة الكولسترول وصبغات الصفراء (bile pigments) وأحياناً لاتحتوي هذه الحصى على الكولسترول وانما تتكون كلياً من صبغات الصفراء النقية . أما حصى الانابيب اللعابية فهي عادة تتكون من مكونات غير عضوية (كالسيوم - مغنيسيوم - كربون ، او فوسفات او اوكسالات) وبالكيمياء السريرية العملية يندر ان يحلل حصى الصفراء وذلك لصعوبة الحصول عليه الا بعد اجراء العملية الجراحية . غير انه يمكن الحصول على معلومات ذات قيمة تشخيصية من تحليل الحصى الكلوي حيث ان في عديد من الحالات قد تطرح حصوة مع البول ان معرفة نوعية تكوين الحصوة ذات فائدة كبيرة فقد تساعد على منع تكوين حصوات جديدة منها تناول اغذية معينة والابتعاد عن اخرى او تناول ادوية او عقاقير تمنع حدوث تكوين وترسيب مكونات الحصوة .

وغالباً مايبدأ تكوين الحصى نتيجة الخمج او التلوث الميكروبي (infection) للجهاز البولي وذلك لانه يساعد على ترسيب بلورات الاملاح في الاماكن الحساسة وفي الحالات الخفيفة والتي يتكون بها حصى بحجوم صغيرة فقد تطرح الحصى بالبول ولكن في الحالات الحادة والتي تصل حجوم الحصى الى حد كبير قد يصل قطرها الى (2–3) سم فعندئذ تكون العملية الجراحية ضرورية .

وان امراض الايض (metabolic diseases) غالباً ماتعمل على تكوين بلورات نقية . فالمرض المصحوب بفقدان سيستين في البول (systinuris) لصاحبه تكون حصى من بلورات السيستين ، فقدان حامض الاوكساليك في البول (oxaluria) يعمل على تكون حصى من هذا الحامض ، كما ان داء النقرس غالباً مايمكن تشخيصه من وجود حصى في البول من حامض اليوريك . كما ان وجود زيادة في طرح الكالسيوم في البول (hypercalciuria) بدون معرفة سببها (idiopathic) كثيراً ماتسبب تكون الحصى من فوسفات اوكسلات الكالسيوم وهذه قد تكون اول ظاهرة تساعد على الكشف على حدوث ورم في الغدة الجنبدرقية (parathyroid gland) .

خطوات الفحص وتحليل الحصوة :

تلاحظ الصفات الوصفية والفيزياوية للحصاة ثم يتم تحويلها الى مسحوق متجانس ويجري التحليل النوعي للمسحوق للكشف عن وجود الكاربونات ، الفوسفات (phosphates) ، الاوكسالات (oxalates) ، حامض البوليك (uric acid) والحامض الاميني السيستين (cystine) .

الاجراء :

اغسل الحصاة او الحصى واحفظها . لاحظ المميزات الفيزياوية ، عدد الحصى ، الحجم الشكل ، اللون واللمعان ، ثم اسحق الحصى بطاحون الى مسحوق ناعم ولاحظ اثناء الطحن صلابة ولون المسحوق ثم اتبع ذلك بالتحليل الكيمياوي .

الكاربونات :

ضع جزء صغير من المسحوق المتجانس في انبوب اختبار ثم اضف اليه كمية من حامض النتريك المخفف البارد (تركيز واحد عياري) .

يستدل على وجود الكاربونات من حدوث فوران وتصاعد غاز ثاني اوكسيد الكاربون والذي يمكن الكشف عنه بأمراره في محلول رائق من هيدروكسيد الكالسيوم (تظهر عكارة نتيجة تكون كاربونات الكالسيوم) ثم اغلي محتويات الانبوب ثم برد ورشح وقسم الراشح الى ثلاثة اقسام واستخدم كل قسم في اجراء مايلي :-

1 - لاختبار الفوسفات :-

اضف الى كمية من الراشح حوالي (1) مللي لتر من محلول مولبيدات الامونيوم وأمزج جيداً واترك المزيج ليستقر بحرارة الغرفة . ان ظهور لون أصفر او راسب يتحول الى الازرق عند اضافة عامل مختزل مثل فيتامين ج او كبريتيت الصوديوم يدل على وجود الفوسفات . ان ظهور اللون الازرق الباهت غالباً مايدل على عدم وجود الفوسفات .

2 - للكشف على وجود الاوكسالات :-

اضف بعض قطرات من محلول كلوريد الكالسيوم وأضف محلول النوشادر قطرة مع المزج الجيد واستمر في اضافة محلول النوشادر حتى يصبح أ س ها للخليط مع الجانب القلوي (تتطلب هذه العملية بضع قطرات فقط من محلول النوشادر) . عندئذ اضف كمية قليلة من حامض الخليك وحتى يصبح أس‌ها (5) ان ظهور راسب ابيض يعني وجود الاوكسالات . (الراسب عبارة عن اوكسالات الكالسيوم) .

وللتأكد من وجود الاوكسالات رشح واجمع البلورات المترسبة على ورقة ترشيح . اغسل البلورات من على ورقة الترشيح بكمية من حامض الكبريتيك المخفف (0.5) عياري المغلي واستقبل محلول الغسيل في انبوب اختبار واحفظه حاراً بوضعه في حمام مائي عند درجة (80)م ثم اضف قطرة تلو الاخرى من برمنغنات البوتاسيوم المخفف . ان اختفاء لون البرمنغنات الوردي بسرعة يؤكد وجود الاوكسالات .

الكشف عن وجود الكالسيوم والمغنيسيوم :-

أضف بعض القطرات من محلول اوكسالات الامونيوم . المشبع وثبت أسها عند (5) كما في **الخطوة السابقة**. ان تكون راسب ابيض يدل على وجود الكالسيوم .

رشح اي راسب ثم أضف الى الراشح بعض قطرات من محلول فوسفات البوتاسيوم وبعض قطرات من محلول النوشادر وحتى يصبح الخليط قلوياً . أن الظهور البطيء لراسب بلوري ابيض والذي هو عبارة عن مركب فوسفات الامونيوم المغنيسيومي (magnenèsium ammonium phosphate) يدل على وجود المغنيسيوم .

الكشف عن حامض البوليك :-

- ضع قليلاً من المسحوق في صحن خزفي . أضف عدة قطرات من حامض النتريك المركز . سخن بهدوء وبخر حتى الجفاف في دولاب الغازات (fume cupboard) ، ثم اضف (2-3) قطرات من الامونيا . ان ظهور لون اصفر غامق او برتقالي يتحول الى بني او بنفسجي ازرق عند اضافة الامونيا يعني وجود حامض البوليك .

- طريقة اخرى تتم بتسخين كمية من المسحوق مع كمية من محلول هيدروكسيد البوتاسيوم (عياري) ثم برد ورشح . ثم يضاف كمية من كاشف فولين (folin) لحامض اليوريك ونقطة من محلول سيانيد الصوديوم الى الراشح . ان ظهور لون أزرق يدلّ على وجود حامض اليوريك (أهمل الآثار الطفيفة من اللون الازرق) .

الكشف على السيستين :-

ضع قليلاً من المسحوق في صحن خزفي . اضف قطرة من محلول سيانيد الصوديوم ثم اتبع ذلك باضافة قطرة من محلول نيتروبروسيد الصوديوم المحضر لتوه . ان ظهور لون أحمر ارجواني (magenta colour) يدل على وجود السيستين .

المحاليل :

محلول الامونيا (5 عياري): خفف (28.6) ملي لتر من محلول هيدروكسيد الامونيوم المركز الى (100) ملي لتر بالماء المقطر .

حامض النتريك (عياري) : ارفع (6.3) ملي لتر من الحامض المركز الى (100) ملي لتر بالماء المقطر .

محلول اوكسالات الامونيوم المشبع : رج جيداً حوالي (4) غرامات في (100) ملي لتر من الماء المقطر .

محلول حامض الخليك (عياري) : خفف (6) مللي لتر من حامض الخليك الجليدي الى (100)مللي لتر بالماء المقطر .

محلول فوسفات البوتاسيوم : يحضر بذوبان (10) غرامات من فوسفات البوتاسيوم (KH_2PO_4) في الماء ويكمل الحجم الى (100) مللي لتر بالماء المقطر .

محلول مولبيدات الامونيوم : ويحتوي على (5) غرامات من مولبيدات الامونيوم في كل (100) مللي لتر من المحلول مستخدماً الماء المقطر .

عامل مختزل : يحضر باذابة (50) مللي غرام من حامض الاسكوربيك في قليل من الماء ويكمل الحجم الى (25) مللي لتر من الماء المقطر (يحضر حديثاً مباشرة قبل الاستخدام) .

محلول كلوريد الكالسيوم : يحضر باذابة (2.5) غرام من كلوريد الكالسيوم في الماء ويكمل الحجم الى (100) مللي لتر بالماء المقطر

حامض الكبريتيك 0.5 عياري) : تخفف (1.40) مللي لتر من الحامض المركز الى (100) مللي لتر بالماء المقطر .

محلول برمنفنات البوتاسيوم المخفف : ويحتوي على (0.3) غرام لكل (100) مللي لتر من الماء المقطر .

محلول سيانيد الصوديوم : يحتوي على (5) غرامات لكل (100) مللي لتر من المحلول في الماء المقطر .

محلول نيتروبروسيد الصوديوم : تذاب بعض البلورات في كمية من الماء ويحضر حديثاً قبل الاستخدام مباشرة .

محلول هيدروكسيد البوتاسيوم (عياري) : ويحتوي على (5.6) غرام من هيدروكسيد البوتاسيوم في كل (100) مللي لتر من المحلول باستخدام الماء المقطر .

محلول فولين (Folin) للكشف على حامض اليوريك :

أذب (200) غرام من تنجستات الصوديوم في (1500) مللي لتر من الماء المقطر . اضف (160) مللي لتر من حامض الفوسفوريك (تركيز 85%) ثم سخن تحت مكثف مرجع (reflux condenser) لمدة ساعتين ثم برد وخفف بالماء وحتى (10) لترات .

التحليل الكمي للحص :

تقدير الفوسفات والاوكسالات في الحصى :

زن (40–50) مللي غرام من مسحوق الحصوة في انبوبة سنترفيوج ثم أضف كمية من محلول حامض الكبريتيك العياري بحيث نحصل على محلول يحتوي على (5) مللي غرام من الحصوة/ المللي لتر واحد . ضع علامة عند مستوى سطح المحلول ثم ضع الانبوب في حمام مائي يغلي لمدة

ساعة مع التقليب بقضيب زجاجي (يترك القضيب في الانبوب) على فترات . برد ثم أغسل القضيب الزجاجي بقليل من الماء وارفعه . أضف كمية من الماء الى العلامة المدونة من قبل أمزج جيداً ثم شغل جهاز الطرد المركزي . لتقدير الفوسفات خفف (1) مللي لتر من المحلول الى (10) مللي لتر بالماء المقطر وقدر الفوسفات كما هو تحت فوسفات البلازما . فلنفرض ان كمية الفوسفور هي (Y) مللي غرام/ (100) مللي لتر (والتي حصلنا عليها من ذوبان (50) مللي غرام من الحصوة في (100) مللي لتر)أي فيه(50) مللي غرام من الحصوة .

∴ (100) غرام من الحصوة تحتوي على (2Y) من الفوسفور .

اي تحتوي على ($2Y \times \frac{310}{62}$) مللي غرام من فوسفات الكالسيوم $Ca_3(PO_4)_2$

∴ الفوسفات (ككالسيوم فوسفات) = (10Y%) من الحصوة

– لتقدير الاوكسالات خذ (1) مللي لتر من المحلول الرائق في انبوبة سنترفيوج واضف (1) مللي لتر من الكاشف المرسب (precipitating agent) اذا لم يظهر راسب بعد عدة دقائق فلا توجد اوكسالات ولا يكمل الفحص . ولكن ظهور راسب ابيض بسرعة يدل على وجود الاوكسالات . اترك الانبوب لمدة ساعة عند حرارة الغرفة ثم شغل في جهاز الطرد المركزي واسكب المحلول العلوي الرائق بهدوء واقلب الانبوبة لتصفى . وبعد ذلك اضف (1) مللي لتر من محلول حامض الكبريتيك (واحد عياري) وضع الانبوب في حمام ماء يغلي الى ان يذوب الراسب . ثم برد وسحح بمحلول برمنغنات البوتاسيوم (0.05 عياري) لحين ظهور اول أثر للون الوردي . اذا استخدم (t) مللي لتر من محلول البرمنجنات فان عيارية الاوكسالات في مستخلص الحصوة تساوي (0.05t) وهذه تعادل (0.05×t×6400) مللي غرام من الاوكسالات في (100) مللي لتر . وهذه هي القيمة التي نحصل عليها من تعليق الحصوة بمعدل (500) مللي غرام/(100) مللي لتر من حامض الكبريتيك وبذا فأن (100) مللي غرام من الحصوة تحتوي على ($\frac{1}{5} \times 0.05 \times t \times 6400$) مللي غرام اوكسالات .

الاوكسالات (ككالسيوم اوكسالات) = (64t%) من الحصوة .

تقدير حامض اليوريك :

زن (10) مللي غرام تقريباً من مسحوق الحصوة في انبوب سنترفيوج تضاف كمية كافية من محلول كربونات الليثيوم بحيث تعطى (1) مللي غرام/(1) مللي لتر . اغلق الانبوب ثم ضعه في حمام مائي عند (37)م لمدة (3–2) ساعات مع المزج على فترات . شغل في جهاز الطرد المركزي وخفف (1) مللي لتر من المحلول الرائق الى (10) مللي لتر بالماء المقطر وقدر كمية حامض اليوريك في هذا المحلول كما هو موضح تحت حامض اليوريك في البلازما .

- فلنفرض ان النتيجة (U) مللي غرام/(100) مللي لتر من المحلول المخفف .
- ان هذا المحلول يمثل (10) مللي غرام من الحصوة في (100) مللي لتر .
- اذن (100) مللي غرام من الحصوة تحتوي على (U×10) مللي غرام حامض اليوريك .
- اذن حامض اليوريك = (10U%) من الحصوة .

المحاليل

حامض الكبريتيك(واحد عياري تقريباً) : تخفف (28) مللي لتر من حامض الكبريتيك المركز الى حجم (1000) مللي لتر بالماء المقطر .

محلول الترسيب : يحضر باذابة (1.25) غرام من كلوريد الكالسيوم في محلول (2.5) مولار من خلات الصوديوم ويكمل الحجم الى (100) مللي لتر بنفس المحلول .

محلول كربونات الليثيوم : يحضر بتركيز (6) غرام في اللتر من الماء .

الفصل الحادي عشر

تحليل البول ـ تحليل حصى الجهاز البولي .

اجهزة التحليل الذاتي في الكيمياء السريرية
(Autoanalyser in Clinical Biochemistry)

تجري حاليا في العديد من الاقطار محاولات جادة لتعميم استخدام أجهزة التحليل الذاتي في مجال التحاليل الكيميائية السريرية في المستشفيات . ومن بين الاجهزة المتوفرة حالياً تجارياً والتي تلاقي نجاحاً ملحوظاً هو المحلل الذاتي من نوع (AAII) والجهاز ذاتي (automatic) بدرجة عالية ويمكن تحميله بنماذج سائل تمرر وتسحب بنجاح في الجهاز (وذلك مثل البلازما او مصل الدم). ويتم داخل الجهاز التفاعلات الكيميائية اللازمة وتظهر النتائج كمنحنيات وقمم (peaks) على مخطط التسجيل (recording chart) . وتبنى فكرة أجهزة التحليل الذاتي على اساس اتمام التفاعلات في مجرى سائل مستمر (continuously flowing stream of liquid) . ويشتمل الجهاز على مضخة متعددة القنوات (multi-channel pump) والتي تعمل اثناء التشغيل بصفة مستمرة حيث تقوم كل قناة بسحب احد الكواشف والذي يوجه الى مجرى خاص من خلال وصلات زجاجية او من المطاط الشفاف على شكل حروف (T) و (H) ، وفي نفس الوقت تقوم احد القنوات بسحب كمية محددة من النموذج تحت الفحص ويخلط مع الكواشف الخاصة به والتي تتدفق بصورة مستمرة . ثم يمرر الخليط في بقية الجهاز حيث يعالج حرارياً او كيمياويا طبقاً لطريقة التحليل المتبعة في الجهاز . وفي النهاية يتم قياس تركيز اللون الناتج من التفاعل في مقياس اللون من نوع (flow-colourimeter) وتسجل قيمة القراءة بوحدات المادة تحت الفحص طبقاً للطريقة المستخدمة بالجهاز للتحليل . ومن الضروري ادخال محاليل قياسية ملائمة مع النماذج الغير معروفة لكي يمكن عمل مقارنة مباشرة وسريعة وللتأكد من صحة تشغيل الجهاز وحسن ادائه .

فكرة واساس عمل وتشغيل أجهزة التحليل الذاتي :

ان الفكرة الرئيسية التي تبني عليها عمل وتشغيل اجهزة التحليل الذاتي بسيطة ، كما وان تشغيل الجهاز عندما يكون صالحاً للعمل سهلة جداً . غير ان المحافظة على الجهاز من قبل المحلل بحيث يكون صالحاً وجاهزاً للاستخدام لا يمكن الوصول اليه والتحقق منه بسهولة الا بالتدريب الجاد والشاق والمخلص وبالخبرة والممارسة الجيدة المستمرة على استخدام الجهاز . ومن الضروري الرجوع الى تفاصيل التشغيل والصيانة عند الرغبة في او الحاجة الى تغيير غشاء التحال (dialyser membrane) او اية قطعة او جزء من الجهاز . والجهاز يتألف من عدد من الوحدات ، تقوم كل وحدة منها على حدة بوظيفة او مفاعلية محددة . ويتم سريان السوائل من وحدة الى اخرى من خلال وصلات مطاطية شفافة . والمضخة الداخلة في تكوين الجهاز من

نـوع (peristaltic) ويتم السيطرة على معـدل جريـان كل كاشف بـالتحكم في القطر الـداخلي للانبوب الواصل الى المضخة والذي يجري فيه هذا الكاشف. وفي معظم طرق التحليل الكيميائيـة السـريريـة لايمكن اجراء التفـاعـلات الكيميـائيـة الضروريـة الاعلى راشح شفـاف خـالي من البروتينات ولذا فأن جهـاز التحليل الـذاتي يشتمل على وحـدات تحـال (dialysing units) لهـذا الغرض .

ويتم عن طريق قنوات المضخة سحب النماذج وتخفيفها وارسالها الى وحدات التحال حيث يتم ابعاد وازالة البروتينات ويخرج السائل الخـالي من البروتينـات الى قنوات على الجـانب الآخر من وحدة التحال حيث ترسل له المضخة الكاشف الملائم . وعندئـذ يتم خلـط كميـة من السـائل الخالي من البروتينات مع كميـة محـددة من الكاشف الملائم . ثم يجري للخليـط المعـاملـة الملائمة للحصول على لون قابل للقياس . ونظراً لأن المعالجة تجري على النماذج والمحـاليل القيـاسيـة فهي ثابتة ومتشابهة ومن غير الضروري ان تستمر عملية التحال لجميع النموذج بل يكفي الجزء الـذي تم خلطه مع الكاشف كما أنه تنمية اللون لاتتم الا على هذا الجزء فقط وعليه ففي اغلب الحالات يتم أكمال التحليل بوقت قصير واعتيادياً يبقى النموذج بـالجهـاز حوالي (10) دقـائق في مجرى التيـار السائل ويستغل منها (2–5) دقائق لعملية التحال . ولمنع اختلاط او تلوث النماذج ببعضها فـأن منحني الشفط (aspiration crook) لايتحرك من نموذج الى آخر الا بعد فترة زمنية يبقى فيهـا بوضع وسطي بعيداً عن النماذج . كما أنه عند أخذ النموذج تبقى انبوب الشفـط منغمراً في النموذج لفترة محددة يرتفع بعدها من النموذج ويمرر به تيـار من الهواء لفترة محـددة ايضـاً بين كل نموذج وآخر ومن ثم فأن تيـار الكاشف يلتقـط على فترات منفصلـة ومتقطعـة جزء من سـائل التحـال والذي يحمل المكونات القابلة للنفاذ والتي تعود الى كل نموذج على حدة . وبهـذه الوضعيـة تؤمن بصورة فعالة عمليـة الفصل بين النماذج . وبـالاضـافـة الى ذلـك فـان كلا المجريين يجهزان بتيـار متدفق من الهواء من خلال خطوط منفصلة على المضخة تعمل على حقن الهواء من خلال فتحـة صغيرة بحيث يتم تقطع (interruption) السائل بمسار منتظم من الفقاعات الهوائية .

كما ان هذه الفقاعات تسـاعد اثناء مرورها بـالخطوط على تنظيف جـدران الانـابيب وتمنع تلوث النماذج ببعضها (cross contamination) . كما انهـا تسـاعـد على خلـط المحـاليل اينما كان ذلك ضرورياً . وللوصول الى دقة عالية في خلط التيارات السـائلة المختلفة فانها تمرر بعـد الخلـط في حلزون زجاجي افقي بما يضمن تقليب (inversion) المحاليل لعدة مرات عند مرورها به .

ان الجهاز مجهز بلوحة تحمل النماذج ويمكنهـا تجهيز النماذج بمعـدل (60, 40, 20) نموذج في الساعة ولاغلب التحاليل الكيميائية السـريرية تكفي نماذج مقدارهـا (0.3) مللي لتر من الـدم او البلازما او البول . وتجدر هنـا الاشارة الى انه ليس من الضروري قياس النموذج عنـد وضعهـا في لوحـة حمل النماذج بل يمكن وضع كميـة من النـوذج في الانـاء المعـد لـذلـك حيث يقـوم منحني

الشفط بأخذ الكمية المحددة والمناسبة خلال الوقت القياسي المحدد لعمل منحني الشفط . وفي لوحة حمل النماذج توضع النماذج في اوعية من البلاستيك سعة (2) مللي لتر وتستخدم مرة واحدة فقط (disposable) وترتب في ثقوب يبلغ عددها اربعون ثقباً وتقع على مسافات متساوية . ويمرر انبوب الشفط البولي ايثيلين المرتبط بالمضخة والذي يحمل منحني معدني يوجه لوقت محدد انبوب الشفط الى كل وعاء (من الاوعية الحاوية على النماذج) وبالتتابع ليسحب كمية محددة وثابته من النموذج ويرتفع بعد ذلك ليعود الى الشفط من النموذج التالي . وفي الفترة التي تدور فيها اللوحة الحاملة للنماذج لاستبدال الكوب بالذي يليه ووضعه تحت منحني الشفط فأنه يتم امرار تيار من الهواء في انبوب الشفط وذلك لازالة ماقد يكون باقي من النموذج السابق . ويمكن ضبط سرعة حامل النماذج على اساس تبديل النماذج المتتالية على فترات (40 ,60 ,120) ثانية بينما تمرر الهواء في الفترات بين شفط النماذج ولمدة (20 ,30 ,60) ثانية على التوالي . وتبلغ كمية النماذج التي تقاس خلال هذه الفترات المحددة والمقاسة في هذه الاوقات بـ (0.2 ,0.3 ,0.6) مللي لتر على التوالي . وتتألف وحدة التحال من لوحتين محددتين (grooved) ومثبتين سوياً مع وجود غشاء سلوفاني (cellophane membrance) بينها . ويشكل كل من الاخدودين على كل جانب من الغشاء مجرى مستمر منفصل كل عن الاخر تماماً بوجود هذا الغشاء . ولكن يمكن المحافظة علي ظروف التحال ثابتة وكذلك ابقاء جهاز التحال صالحاً للاستخدام بصفة مستمرة فأنه يترك مغموراً في حمام مائي عند درجة 37م .

وتختلف سرعة ومعدل نفاذية المكونات المختلفة بالنموذج غير ان (5–25%) من هذه المكونات تعبر اعتياديا الغشاء خلال الوقت الذي يكون فيه النموذج داخل جهاز التحال . ويمكن اذا كان ذلك ضرورياً تسخين تيار الكاشف الحاوي على النموذج الذي تم تحاله وذلك بأن يمرر خلال حلزون زجاجي يبلغ طوله (40) قدم ومغمور في حمام من اثيلين كلايكول (ethylene–glycol) مسخناً عند درجة 37م . أو 95م بواسطة منظم حراري دقيق (precision thermostat) يعمل على ضبط الحرارة بدقة ويمكن الحصول على درجات حرارة اخرى ثابتة حسبما تتطلب طريقة التحليل .

قراءة وتسجيل النتائج :

ينتقل المحلول الملون الناتج من تفاعل الكاشف مع المادة تحت الفحص الى خلية زجاجية تسمى (flow cuvette) حيث يتخلص من فقاعات الهواء ويقرأ تركيز اللون ثم يذهب المحلول الى البالوعة (drain) . ويركز الضوء على الخلية من مصباح خيط تنجستون بواسطة مرآة دائرية (spherical) . وفي نفس الوقت يتم اسقاط ضوء من مصباح مماثل على الخلية المستخدمة

كرجع (reference) . وفي مسار الضوء على كلتا الخليتين تولج مرشحات ضوئية تعمل على انتاج ضوء احادي اللون ذو طول موجي مناسب لطريقة التحليل المستخدمة .

وهذه المرشحات ذات قدرة اختيارية عالية حيث يمكنها التحكم في طول الموجة الى حدود (17) مللي ميكرون في عرض الموجة (band–width) . وهناك نوعان من الخلايا التي تستقبل فيها السوائل الملونة والمعدة لقراءة تركيز لونها : (1) نوع مفتوح على الهواء ومتوفر بأطوال ممرات متباينةلمرور الضوء (diffrent path-light lengths) حيث يدخل اليها السائل الملون وتتصاعد فقاعات الهواء الى الجو من خلال الطرف المفتوح ، (2) النوع الآخر أدخل حديثاً في تصميم اجهزة التحليل الذاتي وهو على شكل انبوبة مغلقة ويتم توجيه السائل الملون قطعة على شكل حرف (T) مثبته في جهاز قياس اللون . وينصح قبل توجيه السائل ان يمرر اولاً خلال ملف تبريد مغمور في ماء بارد اذا كان السائل قد سخن لتوه في الحمام الدافيء المثبتة درجة حرارته عند (95)م . وفي خلال هذه العملية يتم ضخ جزء من السائل في الجزء السفلي من القطعة حرف (T) وكذلك الى الخلية في حين يتسرب الجزء الباقي من السائل والهواء الى البالوعة من خلال الذراع العلوي للقطعة حرف (T) ان الاشارات الكهربائية (electric signals) الناتجة من سقوط الضوء على الخلايا الضوئية تغذى شريط التسجيل وفي نفس الوقت يتم وصول التيار الناتج من الخلية المستخدمة كرجع عبر طول السلك المنزلق . وخلال ذلك تتم مقارنة التيار الناتج من خلية النموذج مع جهد اتصال منزلق (dliding contact) على السلك واي فرق في الجهد يضخم ويستخدم لدفع المنزلق (slider) المتصل به ريشة (pen) في الاتجاه الصحيح حتى يختفي فرق الجهد . وخلال انتقال وتحرك المنزلق ترسم الريشة بصورة مستمرة النسبة المئوية لنفاذ الضوء (peresent transmission) وخلال الخلية يجري بها المحلول الملون العائد لونه الى المادة تحت الفحص .

ومن مزايا هذا النظام (والذي يعرف بنظام الحزم المزدوجة (double–system) انه يقلل من التغيرات التي تنشأ نتيجة لاختلاف الجهد على المصباح المولد للضوء .

وعلى جهاز التسجيل يمثل كل نموذج او محلول قياسي بقمة (peak) على شريط التسجيل البياني . وتكون هذه القمة عريضة اذا تم تمرير النموذج ببطيء وتكون ضيقة اذا زادت سرعة سريان النموذج . وان سرعة سريان النماذج يؤدي الى سرعة تتابعها وهذا بالتالي سيؤدي الى عدم الغسل الجيد للانابيب بين نموذج وآخر . وهذا يعني عدم رجوع الريشة الى خط الاساس (base–line) . وهذا بالتالي يؤدي الى عدم أمكانية تسجيل القمم الواطئة (low peaks) التي تقابل تراكيز منخفضة وخاصة اذا ما جاءت بعد قمة عالية جداً مباشرة . وهنا تجدر الاشارة الى ان الخلية الاسطوانية المغلقة التي تستقبل التيار الساري من المحاليل تسمح بامرار النماذج بسرعة اكثر مما تسمح به الخلية من النوع المفتوح للهواء .

وليس من الضروري ان تكون العلاقة بين التركيز والنسبة المئوية للنفاذية الضوئية حيث انها تعتمد على المطابقة مع قانون (Beer) وعلى تأثير التركيز على سرعة التحال وكذلك على انتاج اللون .

ولهذا السبب فأن الممارسة الاعتيادية تتطلب اجراء عدد من القراءات لمحاليل قياسية ورسم مخطط بياني تستنبط منه قيم النماذج المجهولة تحت الفحص .

وعند تقدير مستوى عدد من العناصر مثل الصوديوم والبوتاسيوم فانه لابد من استبدال استخدام قياس تركيز اللون بجهاز آخر من النوع الذي يقيس لون اللهب (flame photometer) وهنا يتم توجيه سريان المحلول بعد اتمام التحال الى هذا الجهاز الاخير حيث يتحول تحت ضغط خليط من الغاز الى رذاذ دقيق جداً (very-fine-spray) ليحترق في لهب يتكون من اشتغال خليط من الاوكسجين وغاز البروبان (gases mixture of oxygen propane) وهذا اللهب موضوع في وسط متكامل (integrating sphere) مصمم بطريقة تعمل على التقليل من التذبذبات التي تنتج عن تغير حالة ووضع اللهب . وعند تقدير الصوديوم او البوتاسيوم يجب اختبار المرشح الضوئي (light filter) المناسب . ويتم ادخال الليثيوم بسائل التحال كقياس داخلي (internal standard) حيث يستخدم ضوء الليثيوم كمرجع لقياس ضوء الصوديوم والبوتاسيوم .

الطرق المختبرية التي تستتخدم في أجهزة التحليل الذاتي :

لقد أظهرت الشركات المنتجة لهذه الاجهزة مهارة عالية في اختيار الطرق المختبرية التي تعتمد على قياس اللون والمستعملة في الاجهزة التي تنتجها . ويمكن الرجوع الى مخططات السريان (flow-diagrams) وطبيعة تكونات المحاليل وتفاصيل الطرق المتبعة في التحاليل الكيميائية السريرية المطبقة في الجهاز . أن بعض التعديلات قد أدخلت من قبل بعض المختبرات السريرية على الطرق التي يوصى الجهزة بأتباعها وذلك من خلال الممارسة الفعلية والخبرات العالية المتوفرة في عدد من هذه المختبرات ولكن هذا لايعني بأن الطرق المقترحة من قبل المجهز والتي تستخدم في جهاز التحليل الذاتي ليست مرضية تماماً كما لايعني انه لايمكن تطبيق طرق اخرى لتعيين عدد من المكونات الاخرى . بل انها تعني فقط بأن مخططات السريان يمكن ان عدل طبقاً للممارسات الفعلية . عند اختيار المكونات التي يمكن ان يتم تعيينها بالمحلل الذاتي يجب ان يؤخذ في الاعتبار عدد النماذج الواردة للتحليل واذا ماكان من الممكن تأخير ابلاغ النتيجة (اذا لم يكن ضرورياً اعطاء النتائج في نفس اليوم) وذلك حتى يتسنى جمع عدد كاف من النماذج لتهيئة وجبة (batch) ملائمة لابأس بها .

لتشغيل الجهاز . وبصورة عامة اذا كان الطلب هو تحليل عشرة نماذج او أكثر فعندئذ يعدل على الطرق التحليل بالجهاز الذاتي اذا كان متوفراً . ويمكن ان يستخدم جهاز التحليل الذاتي لفحص نموذجين او حتى نموذج واحد اذا كانت الطريقة عالية الكفاءة ومثبته بصورة جيدة (well-established) وممارسة لمدة طويلة وكأي طريقة تحليل اخرى فأن هناك مدى محدود للتراكيز التي يمكن الاعتماد في تحليلها على طريقة مثبتة في جهاز التحليل الذاتي . كما ان حساسية ودقة (sensitivity) الطريقة المستخدمة في المحلل الذاتي تعتمد على تركيز الكواشف وعلى السرعة المثبتة لسريان المحاليل في الخطوط المختلفة . ولذا فاذا ظهر ان الطريقة ليست حساسة ودقيقة بالدرجة المطلوبة وانها تعطي نتائج غير جيدة القيم المنخفضة (low-values) او انها حساسة أكثر من اللازم بحيث يظهر انحراف او شرود (excursion) في منطقة الكثافة الضوئية العالية (region of high optical density) فعندئذ يجب اعادة ضبط الجهاز . اعتيادياً يمكن زيادة حساسية الطريقة بادماج وحدتي نحال بدلاً من وحدة نحال واحدة في حين انه يمكن تخفيض حساسية الطريقة بدرجة كافية بزيادة سرعة سريان سائل التخفيف (diluent) بمجرى النموذج وذلك باستبدال الانبوب بآخر أكبر قطراً أو تقليل سريان محلول النموذج تحت الفحص باستخدام انبوب ذو قطر أصغر وكقاعدة عامة فأن مقارنة النماذج مع محاليل قياسية متدرجة التراكيز تساعد على معرفة متى يمكن أحداث هذه التعديلات بسهولة . غير أنه ينصح دائماً بضرورة المحافظة على مجموع السريان الكلي (total flow) للسائل والهواء بحيث يكون المعدل او المستوى متعادل ومتساو على جانبي وحدة النحال والا فأن السريان على احد الجوانب سيسبق الآخر مؤدياً الى سوء فصل النماذج . وفي جهاز التحليل الذاتي يعتمد سريان المحاليل في الانابيب على القطر الداخلي ولذا فأن الانابيب عليها علامات ملونة تؤشر الى مقياس القطر الداخلي للانابيب وتوضع هذه العلامات الملونة على العنق الطرفي للانبوبة (tuping-collars) ويوضح الجدول التالي هذه الشفرة :-

احجام انابيب المضخة وسرعة سريان المحاليل بها .

لون العنق الطرفي للانابيب	شفرة اللون	القطر بالبوصة	سرعة سريان المحلول/ مللي لتر/ دقيقة
برتقالي واسود	(O/B LK)	(0.005)	(0.015)
برتقالي وأحمر	(O/R)	(0.0075)	(0.030)
برتقالي وازرق	(O/B)	(0.010)	(0.048)
برتقالي واخضر	(O/G)	(0.015)	(0.096)
برتقالي واصفر	(O/Y)	(0.020)	(0.159)

برتقالي وابيض	(O/W)	(0.025)	(0.235)
أسود	BLK	(0.030)	(0.320)
برتقالي	(O)	(0.035)	(0.420)
شفاف	(C)	(0.040)	(0.600)
احمر	(R)	(0.045)	(0.800)
اصفر	(Y)	(0.056)	(1.200)
أزرق	(B)	(0.065)	(1.600)
اخضر	(G)	(0.073)	(2.00)
بنفسجي	(P)	(0.081)	(2.500)
بنفسجي واسود	P/BIK)	(0.090)	(2.900)
بنفسجي وبرتقالي	(P/O)	(0.100)	(3.400)
بنفسجي وشفاف	(P/C)	(0.110)	(3.900)

ملوحظة هامة : ان أحدى المشاكل في التحليل الذاتي والتي يجب العمل على التغلب عليها هي حدوث ضوضاء (noise) او اضطراب اثناء التشغيل والمقصود بذلك هو حدوث تغير وتذبذب في استجابة جهاز التسجيل والتي يستدل عليها من ظهور خطوط غير منتظمة على الشريط الباني بدلاً من ظهور خطوط منتظمة (smooth) . وغالباً ماتوجد هذه الاضطرابات بدرجة بسيطة ومقبولة في التشغيل الاعتيادي غير انه لايجب السماح بتضخمها حيث ان ذلك يهدد دقة النتائج . ومن أهم الاسباب شيوعاً لحدوث هذه الضوضاء العالية هو عدم انتظام مجرى الفقاعات الهوائية في تيارات السوائل ويمكن التغلب على هذه المشكلة بالتنظيف الجيد للجهاز وخصوصاً للوحات التحال (dialysis plates) .

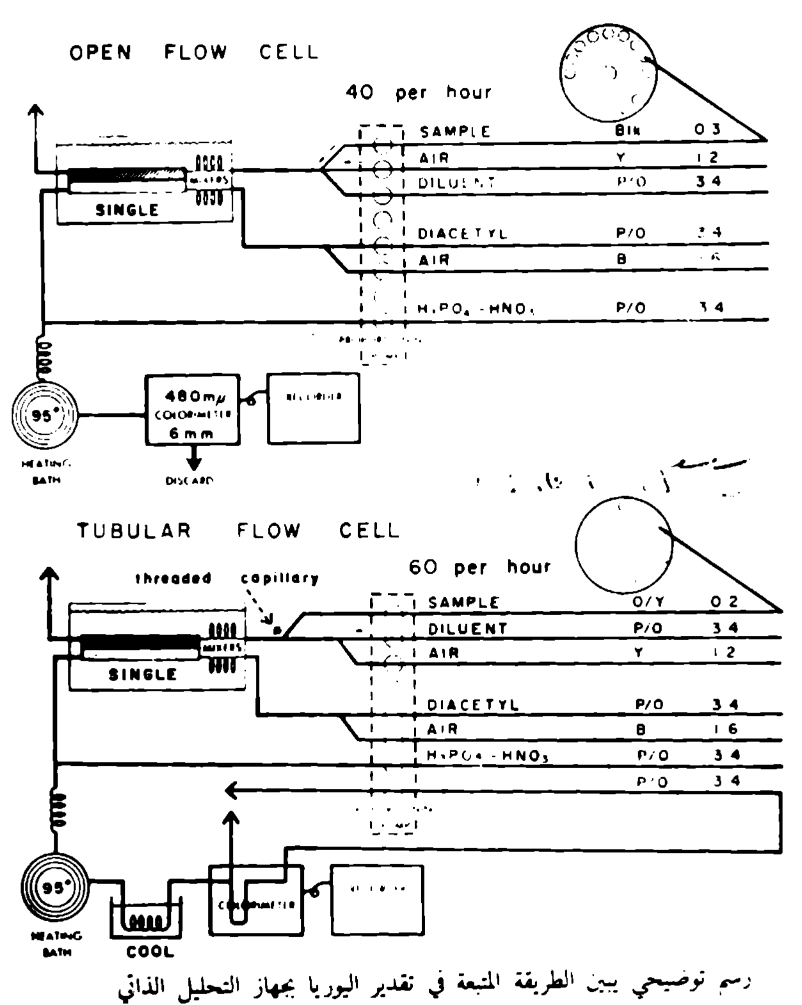
كما يمكن المحافظة على معدل ثابت وجيد لسريان فقاعات الهواء باستخدام عامل مبلل (wetting agent) مناسب لايتداخل ولا يؤثر على الطريقة الكيميائية المتبعة في الجهاز . ومن بين هذه المواد :-

(أ) المادة المعروفة تجارياً باسم (Brij) ولاستخدامها تسخن حتى تتحول الى سائل ويمزج جزء منها مع حجم مساوي من الماء الدافىء ثم يخفف (5)سم3 من الخليط بلتر من الماء اي ان تركيز المحلول المستخدم هو (0.25%) .

(ب) مادة (Tween 20) ويستخدم محلولها كما هو مجهز من قبل الشركة .

جـ) مادة (Teepol) وتستخدم كمحلول (1%) بمزج (1)سم3 من المادة مع 100سم3 من الماء .

وتوضح الرسومات التالية (A) مجرى السوائل في تنظيم الخلية المفتوحة (open flow cells) ، (B) مجرى السوائل في تنظيم الخلية الانبوبية المغلقة (closed tubular flow cell) .



رسم توضيحي يبين الطريقة المتبعة في تقدير اليوريا بجهاز التحليل الذاتي

طرق التحليل المتبعة في جهاز التحليل الذاتي

1) تقدير اليوريا في الدم والبول

أساس الطريقة : يتم تكثيف (condensation) اليوريا مع ثنائي الاسيتل (diacetyl) في وسط حامض ثم يؤكسد الناتج بواسطة مزيج من حامض الفوسفوريك والنتريك ليعطي لون أصفر . ويمكن استعمال هذه الطريقة على نماذج الدم والتي تحتوي لغاية (125) مللي غرام يوريا/ (100)سم3 اما النماذج التي تحتوي على تراكيز يوريا أعلى من ذلك فيمكن تخفيفها بمحلول ملح فسيولوجي .

أما بالنسبة للبول فيجب تخفيفها بنسبة (20:1) .

المحاليل :

أ - سائل التخفيف (للدم والبول) : تذاب (9) غرام من كلوريد الصوديوم النقي مع اضافة عشرة قطرات من كحول الاوكتيل الثنائي (كحول الكابريليك) (sec-Octyl or caprylic) وحتى لتر من الماء المقطر .

ب - كاشف ثنائي الاسيتيل : تذاب (5) غرام من أحادي اوكسيم ثنائي الاسيتيل (diacetyl-monoxime) مع (150) غرام من كلوريد الصوديوم في كمية من الماء ويكمل الحجم وحتى اللتر بالماء .

جـ - مزيج حامض الفوسفوريك - النتريك : يحضر بمزج (400) مللي لتر من الماء (600) مللي لتر من حامض الفوسفوريك تركيز (85%) ، (10) مللي لتر من حامض النتريك المركز .

د - محلول اليوريا القياس المخزون : (1000 مللي غرام/ (100) مللي لتر) يحضر باذابة (1) غرام من مسحوق اليوريا الجاف في كمية من محلول المادة الحافظة ويكمل وحتى (100) مللي لتر من نفس المحلول .

هـ - محلول اليوريا القياسي العامل : يخفف (1) ,(2.5) ,(5) ,(7.5) ,(10) ,(12.5) مللي لتر من محلول اليوريا القياس المخزون الى (100) مللي لتر بمحلول المادة الحافظة . وبذا نحصل على محاليل قياسية تحتوي على (10) ,(25) ,(50) ,(75) ,(100) ,(125) مللي غرام/ (100) مللي لتر .

و - محلول المادة الحافظة : تذاب (40) مللي غرام من خلات فينيل الزئبقيك (phenylmercuric acetate) في لتر من حامض الكبريتيك تركيز (0.01) عياري .

2) حامض اليوريك (uric acid)

اساس الطريقة :

تعتمد الطريقة على اختزال كاشف (Folin) وهو عبارة عن حامض فوسفو - تنجستيك (phosphotungstic acid) بواسطة حامض اليوريك حيث ينتج لون ازرق . ويزيد اضافة آثار من سيانيد الصوديوم من حساسية ودقة الكشف . والطريقة بسيطة ويمكن تطبيقها على نماذج المصل والبول الذي تم تخفيفه بنسبة (10:1) .

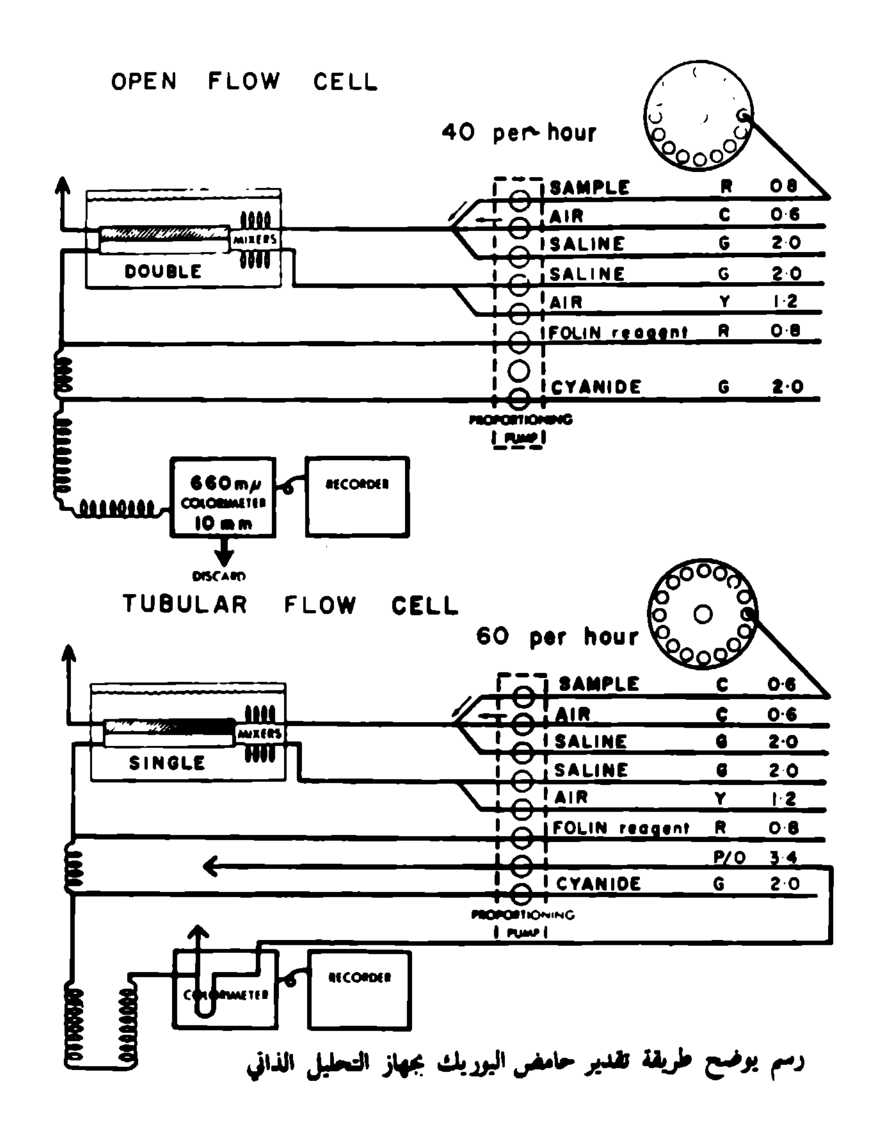
المحاليل :

أ - **محلول ملح الفوسيولوجي** : بتركيز (9) غرام من كلوريد الصوديوم في لتر من الماء المقطر . ويستخدم هذا المحلول لتخفيف نماذج المصل والبول وكسائل جاري مستقبل (recipient) .

ب - **محلول سيانيد الصوديوم** : بتركيز (50) غرام من سيانيد الصوديوم ، (2) مللي لتر من محلول النوشادر المركز في لتر من الماء المقطر .

جـ - **كاشف فولن (Folin)** : تذاب (200) غرام من تنجستات الصوديوم في (1500) مللي لتر من الماء . ثم يضاف (160) مللي لتر من حامض الفوسفوريك المركز (تركيز 85%) وعدد من الكرات الزجاجية (التي تساعد على توزيع الحرارة عند تسخين وتمنع الفوران المفاجىء) واغلي تحت مكثف مرجع (reflux condenser) لمدة ساعتين ثم برد وخفف الى (10) لترات بالماء .

د - **محلول حامض البوليك القياسي المخزون** : (تركيز (100) مللي غرام/ (100) مللي لتر من الماء) ويحضر بذوبان (0.6) غرام من كربونات الليثيوم في (150) مللي لتر من الماء البارد وسخن الى درجة (60)م .



رسم يوضح طريقة تقدير حامض اليوريك بجهاز التحليل الذاتي

ثم اضف (1) غرام من حـــامض البـوليـــك وحرك جيـــداً حتى يختفي . برد ثم ااضف (20) مللي لتر من الفورمالين (40% محلول فورمـالـدهيـد) ثم خفف بحوالي (500) مللي لتر من الماء وأضف (25) مللي لتر من حامض الكبريتيك (تركيز (1) عياري) وأكمل حتى اللتر بالماء .

هـ - محلول حامض البوليك القيـاسيـة العـاملـة : خفف (1) ،(2) ،(4) ،(6) ،(8) ،(10) ، ملي لتر من محلول حامض البوليك القياسي المخزون الى (100) مللي لتر بـالمـاء وبـذا نحصل على محـاليل قياسية تحتوي على (1) ،(2) ،(4) ،(6) ،(8) ،(10) مللي غرام لكل (100) مللي لتر .

و - عـامل مبلل : (1% تيبول) اضف (10) قطرات من العـامل المبلـل الى كل لتر من محلـول الملح الفوسيولوجي .

الكرياتينين والكرياتين (Creatine and creatinine)

اساس الطريقة :

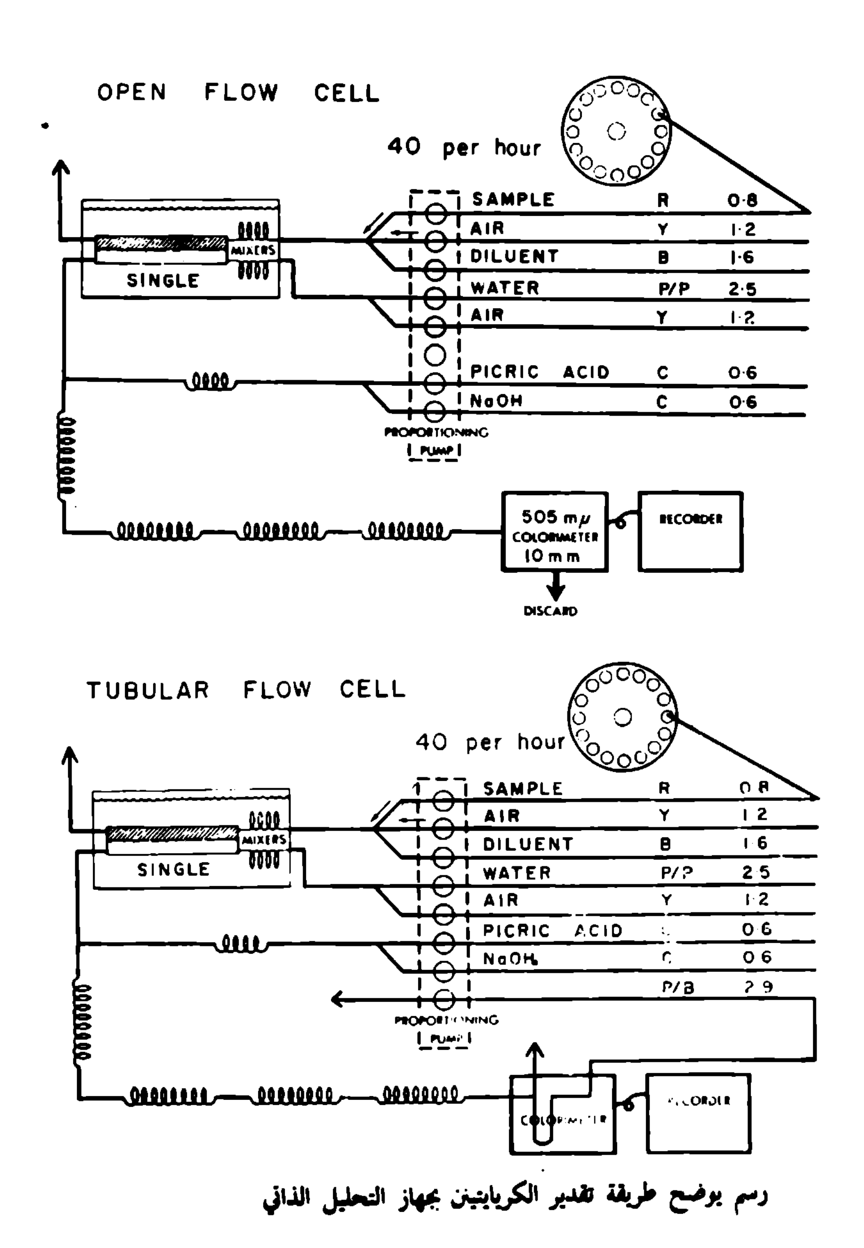
يستخدم تفاعل (jaffe) الذي يعتمد على ظهور لون أحمر عند تفاعل الكرياتنين مع محلول قلوي لحامض البكريك (alkaline-picrate) وتساعد عملية التحال على ازالة المواد الملونة الموجودة في مصل الدم والتي تؤثر على النتيجة . ويجب تخفيف نماذج البول بنسبة (1) : (10) أو (1):(20) . أما الكرياتين فيجب ان يتحول بالتسخين الى كرياتنين ثم يقدر الكرياتنين الكلي (الكرياتنين الاصلي + الكرياتنين الناتج من تسخين الكرياتين) ، ونستحصل على قيمة الكرياتين بالطرح وتحول القيمة الى كرياتين بالضرب في المعامل (1.16) أو تمثل بوحدات كرياتنين .

المحاليل :

أ - سائل التخفيف : محلول ملح فسيولوجي تركيز (9) غرام في اللتر من الماء .
ب - محلول حامض البكريك المشبع : (13) غرام من الحامض في اللتر من الماء .
جـ - محلول هيدروكسيد الصوديوم : (0.5 عياري) (20) غرام في اللتر من الماء .
د - محلول الكرياتينين القياسي المخزون : (100 مللي غرام/ (100)سم3) اذب (1.60) غرام من ملح كلوريد زنك الكرياتينين النقي في حامض هيدروكلوريك تركيز (0.1) عياري وأكمل حتى اللتر .
هـ - محاليل الكرياتينين القياسية العاملة : خفف (1)، (2)، (4)، (6)، (8)، (10) مللي لتر من محلول الكرياتينين القياس المخزون وحتى (100) مللي لتر بالماء فنحصل على محاليل قياسية تركيز (1)، (2)، (4)، (6)، (8)، (10) ﴿مللي غرام كرياتنين/(100) مللي لتر.﴾
و - السائل المبلل : (Tween 20) اضف (10) قطرات لكل لتر من محلول الفوسيولوجي .

ملحوظة :

لتحويل الكرياتين سخن (٥٠) مللي لتر من البول مع (10) مللي لتر من حامض الهيدروكلوريك (1) عياري عند (120)مْ وضغط (14) رطل لمدة (20-30) دقيقة في اوتوكلاف . برد ثم اضف للمحلول (20) مللي لتر من محلول هيدروكسيد الصوديوم (0.5) عياري وخفف حتى (100) مللي لتر . ثم شغل في جهاز التحليل الذاتي ﴿يلاحظ ان البول بهذه المعاملة خفف بنسبة (10:1) ﴾ . واذا كان تركيز الكرياتنين عاليا اعد التحليل بعد التخفيف بنسبة (1:1) ليصبح التخفيف (20:1) .

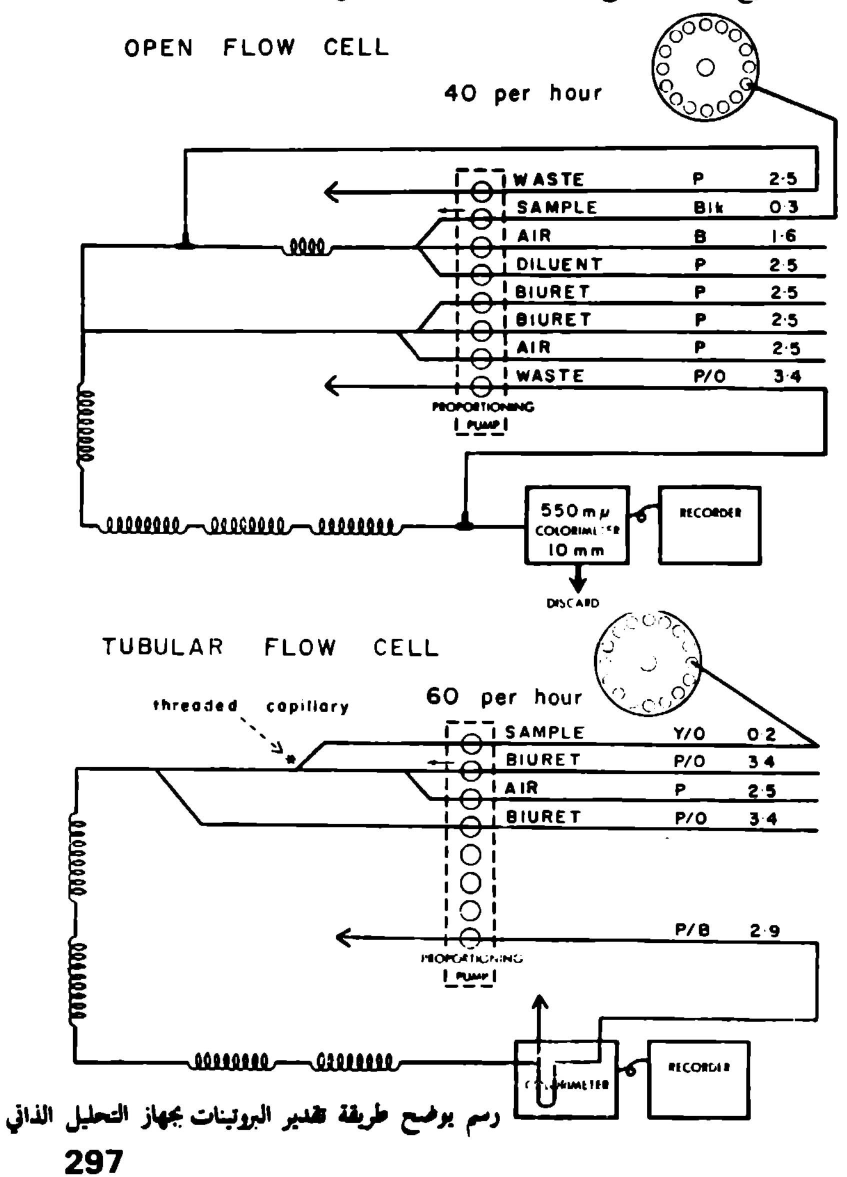


رسم يوضح طريقة تقدير الكرياتينين بجهاز التحليل الذاتي

البروتينات الكلية في بلازما الدم

اساس الطريقة :

تعتمد الطريقة على اختبار (Biuret test) حيث تتفاعل الاواصر الببتيدية في جزء البروتين مع كبريتات النحاس القاعدية منتجة لون ارجواني (purple) يمكن استخدام كل من مصل الدم او البلازما ـ اما اذا كان النموذج به كمية كبيرة من الدهون المعلقة (lipaemic) او بها يرقان ﴿مستوى البيليروبين اعلى من (5) مللي غرام / (100) سم3﴾ فان النتيجة ستكون عالية وفي مثل هذه الحالة يجب تشغيل نموذج سيطرة يحل فيه مخفف الترترات بدلا من محلول البيوريت وتطرح قراءة النموذج السيطرة من قراءة النموذج للحصول على التركيز الصحيح .



رسم يوضح طريقة تقدير البروتينات بجهاز التحليل الذاتي

المحاليل :

أ - **مخفف الترترات :** يحتوي على (9) غرام من صوديوم بوتاسيوم ترترات و (5) غرام من ايوديد البوتاسيوم في لتر من محلول هيدروكسيد الصوديوم (0.2) عياري .

ب - **كاشف البيروريت :** تذاب (9) غرام من صوديوم بوتاسيوم ترترات في (500) مللي لتر من محلول هيدروكسيد الصوديوم (0.2) عياري . ثم اضف (3) غرام من كبريتات النحاس ($CuSO_4.5H_2O$) وحرك حتى يتم الذوبان تماما . ثم اضف (5) غرام ايوديد البوتاسيوم وحرك ليتم ذوبانها ثم اكمل الى اللتر بواسطة محلول هيدروكسيد الصوديوم (0.2) عياري .

ج - **محلول البروتين القياس العامل :** يمكن تحضيرها من محلول البيومين البقر تركيز (30%) . خفف (4) ، (5) ، (6) ، (7) ، (8) ، (9) مللي لتر الى (30) مللي لتر بواسطة محلول حامض البنزويك المشبع وبذا نحصل على محاليل تحتوي على(4) ، (5) ، (6) ، (7) ، (8) ، (9) غرام / (100) مللي لتر . ويمكن تحديد تركيز المحاليل بدقة عالية باستخدام محلول قياسي معلوم التركيز بدقة عالية .

د - **محلول بروتين قياس معلوم التركيز بدقة عالية :** عادة يحتوي هذا المحلول على (4–9) غرام / (100) مللي لتر ويمكن تحضيره من مصل قدرت محتوياته من البروتينات بواسطة طريقة (Kjeldahl method) أو محلول سيطرة تجاري معلوم التركيز . او بتحضير محلول (Armour) القياسي الذي يحتوي على نسبة محددة من النيتروجين البروتين والذي يمكن معرفة تركيز البروتين بضرب قيمة محتواه من النيتروجين X (6.25) .

تقدير الجلوكوز (Glucose determination)

أساس الطريقة : تعتمد الطريقة على اختزال محلول سيانيد بوتاسيوم الحديديك الى مركب سيانيد بوتاسيوم الحديدوز عديم اللون بواسطة الجلوكوز في وجود اثار من السيانيد لزيادة حساسية التفاعل . وفي حين ان هذا الاختبار ليس نوعيا خاصا بالجلوكوز الا ان معظم المواد المختزلة التي قد تؤثر على التفاعل تزال خلال عملية التحال ويبلغ تأثيرها بما لا يزيد على (5) مللي غرام /(100) مللي لتر بالمقارنة مع طريقة تقدير الجلوكوز بالانزيم المؤكسد وتطبق هذه الطريقة على الدم الشعيري (capillary blood) ويتم تخفيف الدم بنسبة (21:1) بمزج (0.05) مللي لتر دم مع (1) مللي لتر محلول متوازن التوتر من كبريتات الصوديوم (isotinic sodium sulphate) والطريقة تصلح للتطبيق على نماذج الدم وحتى تركيز (400) مللي غرام / (100) مللي لتر وان حساسية الطريقة منخفضة عند التراكيز الواطئة .

المحاليل :

أ ـ محلول كبريتات الصوديوم متوازن التوتر : يحتوي على (13.2) غرام من كبريتات الصوديوم اللامائية او (30) غرام من كبريتات الصوديوم المائية ($Na_2SO_4.10H_2O$) في لتر من الماء .

ب ـ محلول سيانيد البوتاسيوم : يحتوي على (5) غرام من سيانيد البوتاسيوم ، (9) غرام من كلوريد الصوديوم في اللتر من الماء المقطر .

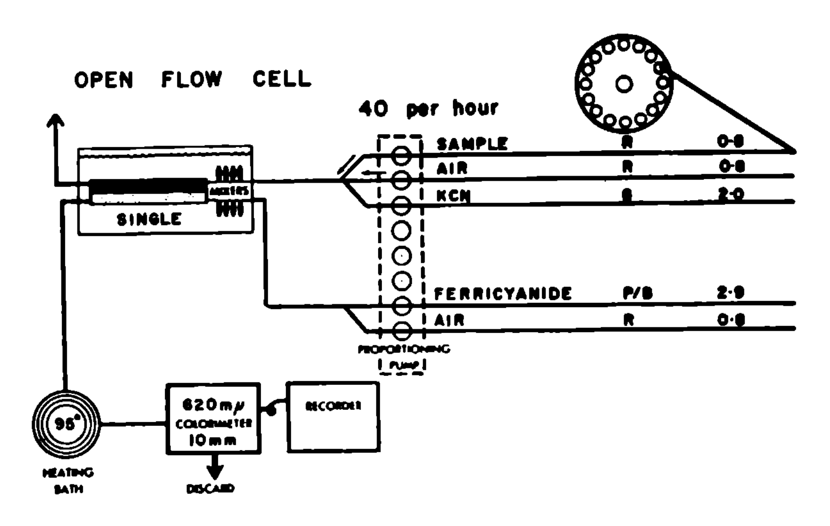
جـ – المذيب القلوي لسيانيد بوتاسيوم الحديديك : تذاب (20) غرام من كربونات الصوديوم اللامائية في (100) مللي لتر من الماء المغلي ثم يضاف الى المحلول (9) غرام من كلوريد الصوديوم في (300) مللي لتر من الماء ثم يرفع الحجم الى اللتر بالماء المقطر .

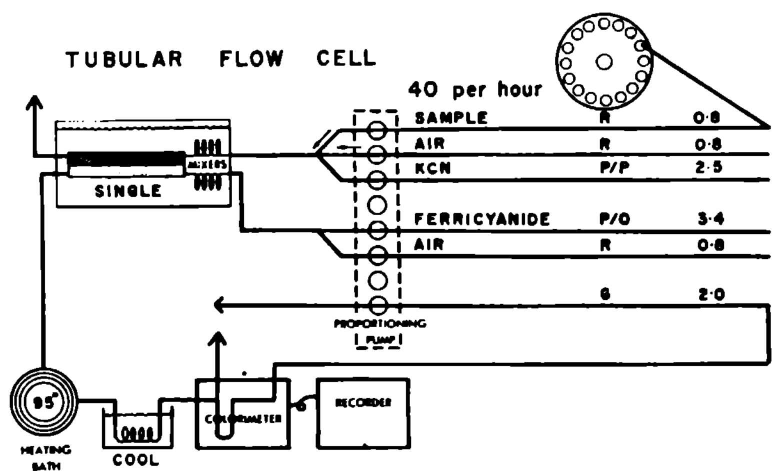
د ـ محلول سيانيد بوتاسيوم الحديديك : للاجهزة ذات الخلية المفتوحة يحضر باذابة (0.375) غرام من الملح في لتر من المذيب القلوي السابق . وبالاجهزة ذات الخلية الانبوبية المغلقة يحضر باذابة (0.2) غرام في لتر من المذيب القلوي السابق . تحضر هذه المحاليل كل بضعة ايام بصورة طازجة .

هـ ـ محلول الجلوكوز القياس المخزون : ﴿يحتوي على (95) مللي غرام / (100) مللي لتر﴾ ويحضر باذابة (0.95) غرام من الجلوكوز النقي الجاف في اللتر من محلول حامض البنزويك المشبع ﴿تركيز 0.3%﴾ .

و – محاليل الجلوكوز القياسية العاملة : يخفف (1.25)، (2.50) (5.0)، (10)، (15)، (20) مللي لتر من المحلول القياسي المخزون الى (100) مللي لتر بمحلول حامض البنزويك المشبع وبذا نحصل على محاليل مخففة (1:21) من تراكيز (25)، (50)، (100)، (200)، (300)، (400) مللي غرام جلوكوز/(100) مللي لتر .

ز ـ السائل المبلل : (Tween 20) اضف (10) نقطة لكل لتر من محلول سيانيد بوتاسيوم الحديديك .





رسم يوضح طريقة تقدير الجلوكوز بجهاز التحليل الذاتي

تقدير الفوسفات في الدم (Inorganic phosphate)

اساس الطريقة : يتم تحال النموذج حيث تخرج الفوسفات وتتفاعل مع حامض الموليبديك . ثم تختزل الفوسفوموليبيدات بواسطة حامض امينونا فثولسلفونيك (amino- naphthol- sulphonic acid ANS) لتعطي لون ازرق . ويمكن تطبيق الطريقة على مصل الدم وكذلك البول بعد تخفيفه (10:1) قبل التحليل .

المحاليل :

أ ـ **السائل المخفف :** محلول الملح الفسيولوجي تركيز (0.9%) في الماء المقطر .

ب ـ **المحلول (ANS) المخزون :** اذب (110) غرام من ميتابيكبريتيت الصوديوم (sodium metabisulphite) و (4) غرام من كبريتيت الصوديوم اللامائية في (650) مللي لتر من الماء . سخن الى درجة (50 م) ثم اضف (2) غرام من حامض 1 ـ امينو ـ 2 نفثول ـ 4 سلفونيك وحرك جيدا ليتم الذوبان . اكمل الى اللتر بالماء ورشح واحفظ في زجاجة بنية . يبقى هذا المحلول عند درجة حرارة الغرفة صالحا للعمل لعدة اشهر .

جـ ـ **محلول (ANS) العامل :** خفف (100) مللي لتر من محلول (ANS) المخزون الى اللتر بالماء واخزن في زجاجة بنية . هذا المحلول صالح للاستخدام لمدة شهرين .

د - **محلول المولبيدات الحامضية :** اذب (7.5) غرام من مولبيدات الامونيوم وحتى اللتر من حامض الكبريتيك تركيز (2) عياري .

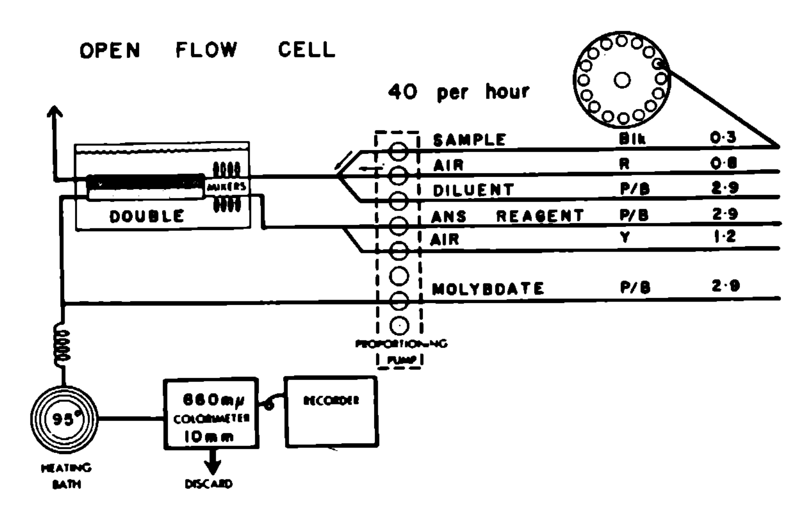
هـ - **محلول الفوسفات المخزون :** (يحتوي على 200 مللي غرام من الفوسفور/ (100) مللي لتر) تذاب (4.39) غرام من فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين (KH_2PO_4) وحتى (500) مللي لتر من الماء .

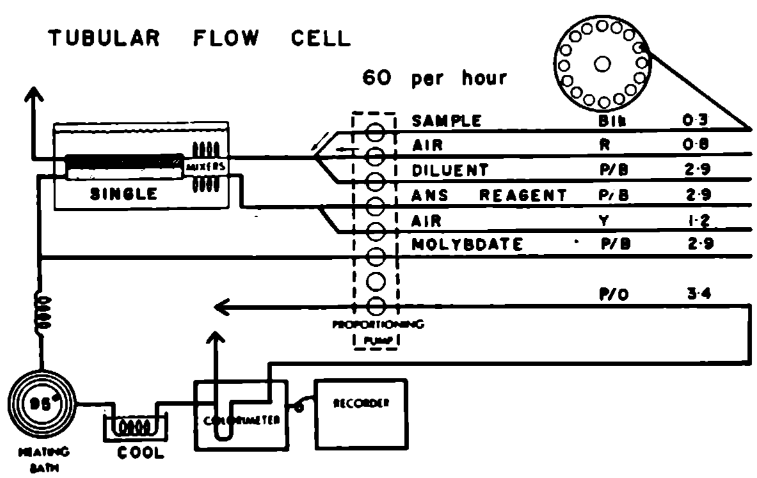
و - **محاليل الفوسفات القياسية العاملة :** خفف (1)، (2)، (3)، (4)، (5)، (10) مللي لتر من محلول فوسفات القياس المخزون الى (100) مللي لتر بالماء وبذا نحصل على محاليل قياسية تحتوي على (2)، (4)، (6)، (8)، (10)، (20) مللي غرام فوسفور/(100) مللي لتر .

ز - **السائل المبلل :** (1% تيبول) . اضف (10) نقط الى كل من السائل المخفف ، محلول الاختزال .

تقدير البيكربونات في بلازما الدم (Plasma bicarbonate)

اساس الطريقة : تقيس هذه الطريقة كل من البيكربونات ، ثاني اوكسيد الكربون الذائب في البلازما ، حامض الكربونيك . يجري تخفيف البلازما وتحميضها (acidified) ثم تجزء باستخدام الهواء حيث ينفصل ويتصاعد ثاني اوكسيد الكربون مع الهواء في مصيدة (trap) ثم يمرر هذا الهواء المحمل بثاني اوكسيد الكاربون في محلول دارئي للفينولفثالين حيث تتغير أس‌ها المحلول ويتغير لونه وان التغير في تركيز اللون يتوقف على كمية ثاني اوكسيد الكربون بالنموذج والكمية التي تمتص بواسطة المحلول الدارئي للفينوبفثالين .





رسم يوضح طريقة تقدير الفوسفات بجهاز التحليل الذاتي

للاقلال من فقدان ثاني اوكسيد الكربون من النموذج لحين تشغيله في الجهاز توضع بضع نقاط من زيت خفيف (Light oil) يطفو فوق سطح البلازما لحين استخدامها .

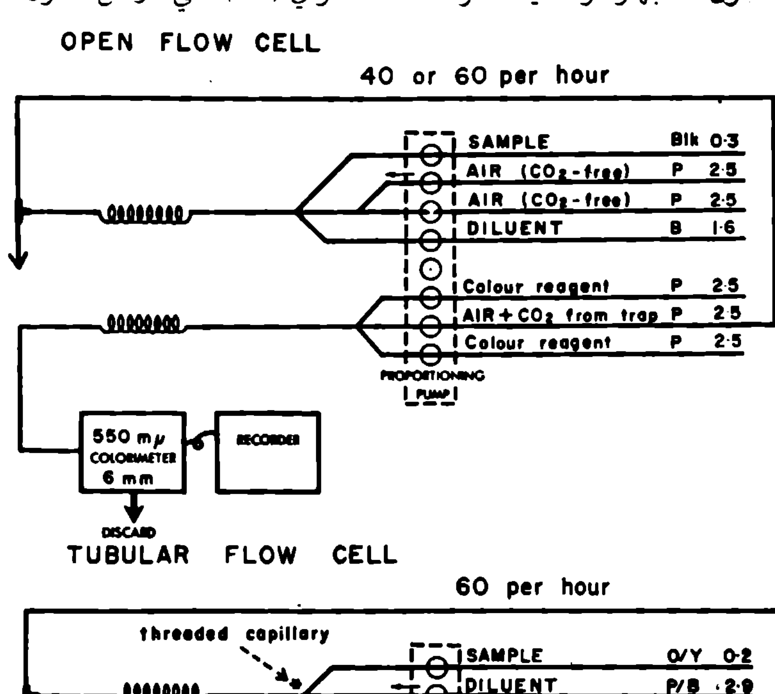
المحاليل :

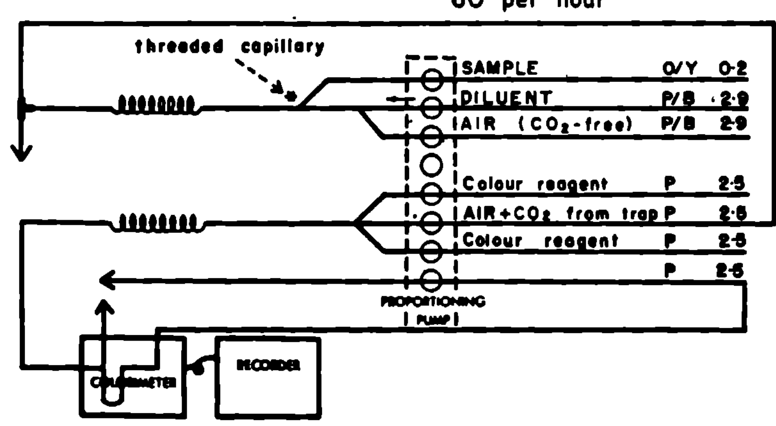
أ - **المحلول المخفف :** يحتوي على (2.8) مللي لتر من حامض الكبريتيك المركز في اللتر من الماء . أضف (1) مللي لتر من مانع الرغوة لكل لتر ورج جيداً قبل الاستعمال .

ب - **المحلول الداريء او المنظم :** يحضر بأذابة (35) غرام من كربونات الصوديوم ، (56) غرام من بيكربونات الصوديوم في الماء وحتى اللتر .

جـ - **محلول الفينولفثالين :** يذاب (1) غرام في (100) مللي لتر من كحول المثيل .

د - **كاشف اللون :** للجهاز ذو الخلية المفتوحة اضف حوالي (5.5) مللي لتر من المحلول الدارئي





رسم يوضح طريقة تقدير البيكربونات في البلازما بجهاز التحليل الذاتي

(4.5) مللي لتر من محلول الفينولفثالين الى لتر من الماء . للجهاز ذو الخلية الانبوبية المغلقة يستخدم (3.5) مللي لتر من المحلول الدارئي ، (1.5) مللي لتر من محلول الفينولفثالين الى لتر من الماء .

ويمكن التحكم في الكميات اذا علم ان محلول قياسي ذو تركيز (40) مللي مكافيء يسجل (%80–90) نفاذ ضوئي (زيادة الفينولفثالين يقلل نسبة النفاذ ، زيادة المحلول الدارئي يقلل من حساسية الاختبار) .

هـ - محلول الكربونات القياسي المخزون : (يحتوي على 200) مللي لتر مكافيء/ اللتر) ويحضر بأذابة (21.2) غرام من كربونات الصوديوم اللامائية في الماء ويكمل بالماء المقطر الى اللتر .

و - محاليل الكربونات العاملة : خفف (5)، (8)، (11)، (14)، (17)، (20) مللي لتر من محلول الكربونات القياسي المخزون الى (100) مللي لتر بالماء لنحصل على محاليل ذات تراكيز (10)، (16)، (22)، (28)، (34)، (40) مللي مكافيء/اللتر .

ملحوظة : لتجنب التلوث بثاني اوكسيد الكربون الجوي يمرر الهواء قبل دخوله الجهاز على وعاء يحتوي على محلول هيدروكسيد الصوديوم (1) عياري لامتصاص مابه من ثاني اوكسيد الكربون ونفس الاحتياط يتبع لضمان عدم وجود ثاني اوكسيد الكربون في الحيز فوق المحلول كاشف اللون .

تقدير الكلوريد في مصل الدم او البلازما (serum and plasma chlorid)

اساس الطريقة : يتم تحال البلازما او مصل الدم المخفف ضد تيار مائي مخلوط يحتوي على ثيوسيانات الزئبقيك ونترات الحديديك . ان ايونات الكلوريد تكون مع السائل المستقبل مركب كلوريد الزئبقيك وفي نفس الوقت تحل محل كمية مكافئة من آيونات الثيوسيانات والاخيرة تعطى لون أحمر مع ملح الحديديك .

ولزيادة حساسية الطريقة تضاف كمية قليلة من نترات الزئبقيك للكاشف بحيث ان اول (60) مللي مكافيء من الكلوريد تعطى لون ومن ثم تزيد من الفروقات في الكثافة الضوئية بين تراكيز الكلوريد المنخفضة والعالية .

المحاليل :

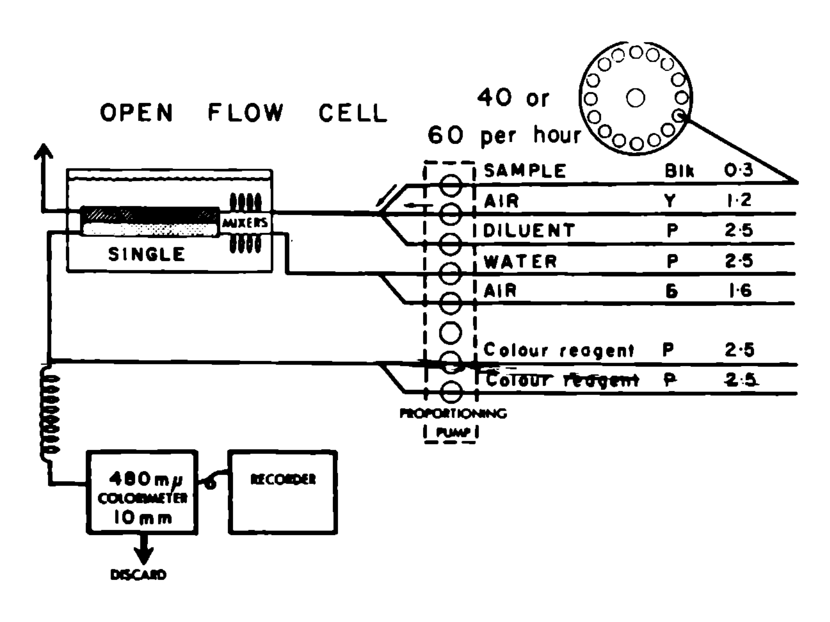
أ - **المحلول المخفف :** يحتوي على (16) مللي لتر من حامض الكبريتيك المركز بالاضافة الى (1) مللي لتر من محلول (25%) (Brij) في اللتر من الماء .

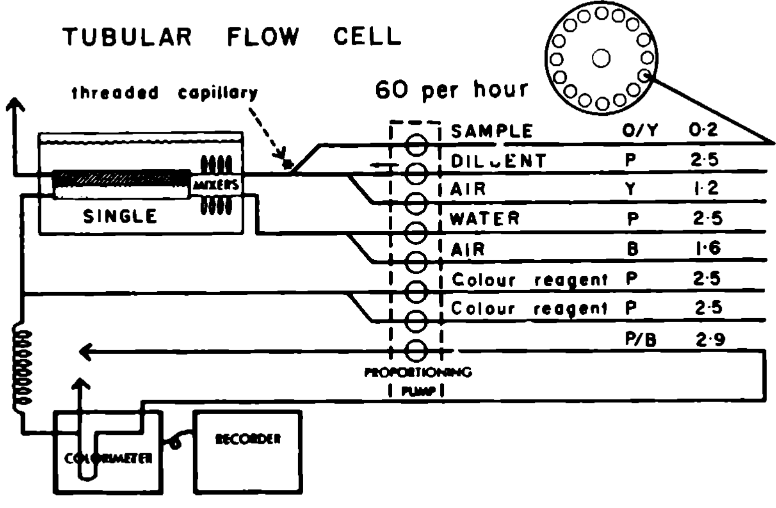
ب - **ثيوسيانات الزئبقيك :** (محلول مشبع) ، اترك (3) غرام من ثيوسيانات الزئبقيك في لتر من الماء مع الرج من وقت لآخر . ثم رشح ويصبح المحلول جاهزاً للاستخدام .

جـ - **نترات الحديديك :** يحتوي على (200) غرام من نترات الحديديك . (22) مللي لتر من حامض النتريك المركز في اللتر من الماء .

د - **نترات الزئبقيك :** يحتوي على (68.5) غرام من نترات الزئبقيك ، (9) مللي لتر من حامض النتريك المركز في اللتر من الماء .

هـ - **كاشف اللون :** امزج (900) مللي لتر من محلول مشبع من ثيوسيانات الزئبقيك مع (100) مللي لتر من محلول نترات الحديديك واضف محلول نترات الزئبقيك بمعدل (6) مللي لتر لكل لتر في الاجهزة ذات الخلية المفتوحة للهواء وبمعدل (4) مللي لتر في الاجهزة ذات الخلية الانبوبية المغلقة . وافضل تركيب لهذا المحلول يعطي (90%) نفاذ ضوئي لمحلول يحتوي على (70) مللي مكافيء لكلوريد /اللتر .





رسم توضيحي لطريقة تقدير الكلوريد بجهاز التحليل الذاتي

و - **محلول الكلوريد القياسي المخزون** : (يحتوي 1000 مللي مكافيء /اللتر) ويحتوي على (58.5) غرام من كلوريد الصوديوم الجاف في اللتر من الماء .

ز - **محاليل الكلوريد القياسية العاملة** : تخفف (7)، (8)، (9)، (10)، (11)، (12) مللي لتر من محلول الكلوريد القياسي المخزون الى (100) مللي لتر بالماء نحصل على محاليل تكافيء (70)، (80)، (90)، (100) ، (110)، (120) مللي مكافيء في اللتر .

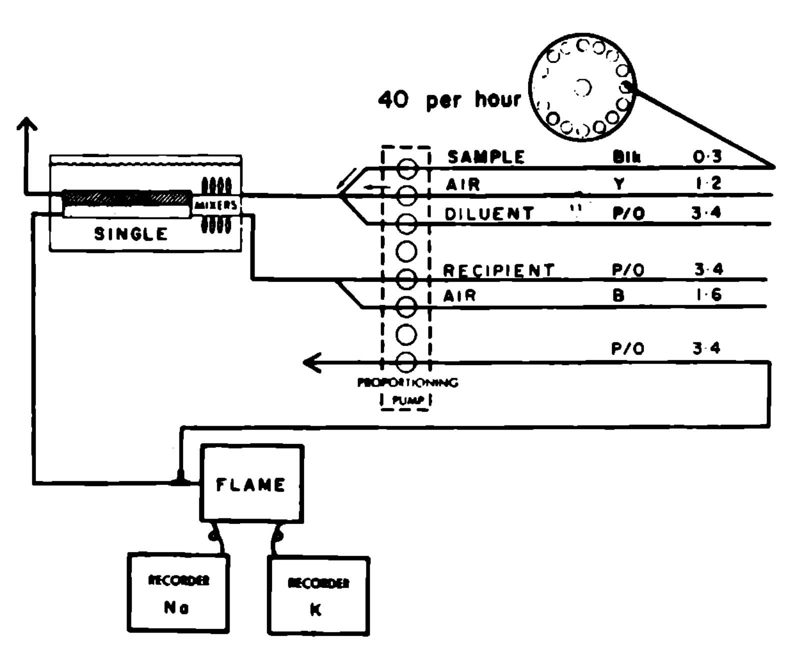
ح - **السائل المبلل** : (Tween 20) اضف (10) نقط الى اللتر من محلول تيار السائل المستقبل .

تقدير الصوديوم والبوتاسيوم بمصل الدم

(Serum sodium and potassium)

أساس الطريقة : يستخدم جهاز قياس ضوء اللهب . وان السائل المستقبل الجزء بالهواء يحتوي على الصوديوم والبوتاسيوم والليثيوم ويمر في انبوب حرف (T) ومنها يضخ الهواء ومعظم السائل الى البالوعة في حين يمر الجزء الباقي من السائل الى مقياس اللون خلال انبوبة قصيرة على قدر الامكان .

وللتغلب على الفروقات التي تحدث من اختلاف سرعة تيارات الهواء يتم ادخال محاليل قياسية قبل وبعد تحليل كل وجبة من النماذج . كما وأن في كل وجبة يجب ادخال محلول قياسي (130 مكافيء/اللتر) من صوديوم وآخر (4 مللي مكافيء/اللتر) من البوتاسيوم وكذلك نموذج المصل سيطرة .



رسم يوضح طريقة تقدير الصوديوم والبوتاسيوم بجهاز التحليل الذاتي

المحاليل :

أ - **المحلول المخفف** : خفف (125) مللي لتر من محلول ليثيوم مخزون الى لتر بالماء وأضف (20) نقطة من كحول الاوكتيل الثنائي (كابريليك) .

ب - **محلول الليثيوم المخزون** : تذاب (123) غرام من نترات الليثيوم ($LiNO_3 .3H_2O$) في كمية من الماء مع (53) مللي لتر من حامض الكبريتيك المركز ويخفف المحلول الى اللتر بالماء .

جـ - **المحلول المستقبل** : خفف (200) مللي لتر من المحلول المخفف الى (1200) مللي لتر بالماء .

د - **محلول الصوديوم القياسي المخزون** : (يحتوي على 1000 مللي مكافىء / اللتر) يحضر باذابة (58.5) غرام من كلوريد الصوديوم الجاف النقي في الماء وحتى اللتر .

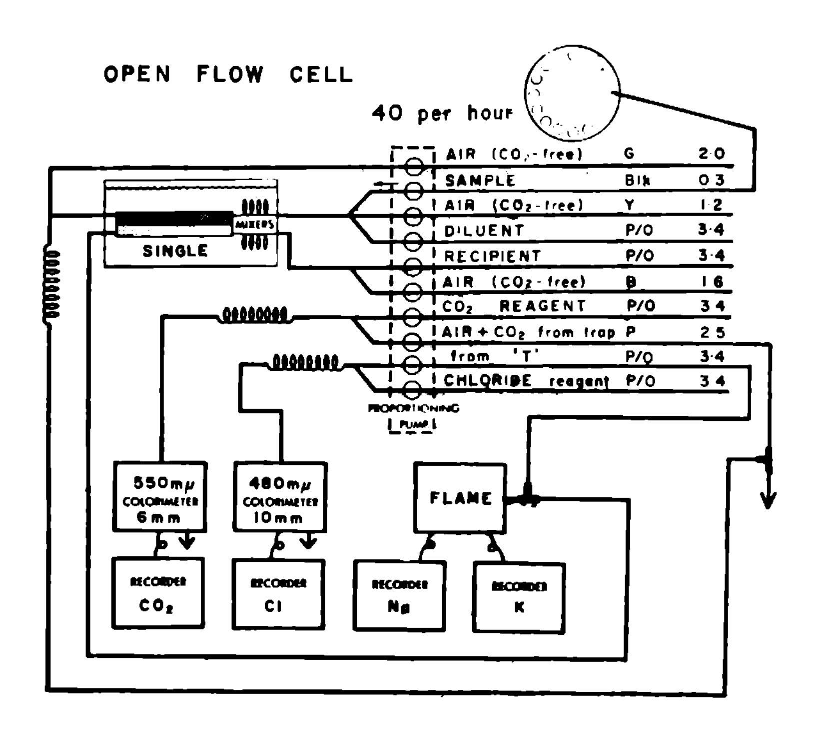
هـ - **محلول البوتاسيوم القياسي المخزون** : (يحتوي على (100) مللي مكافىء / اللتر) يحضر باذابة (7.46) غرام من كلوريد البوتاسيوم الجاف النقي في الماء حتى اللتر .

و - **المحاليل القياسية العاملة الخليطة :**

كمية المللي مكافىء في اللتر		مللي لتر من المحلول القياس المخزون / (100) مللي لتر	
صوديوم	**بوتاسيوم**	**كلوريد الصوديوم**	**كلوريد البوتاسيوم**
(110)	(2)	(11)	(2)
(120)	(3)	(12)	(3)
(130)	(4)	(13)	(4)
(140)	(5)	(14)	(5)
(150)	(6)	(15)	(6)
(160)	(7)	(16)	(7)

ز - السائل المبلل : (Tween 20) اضف (3) نقط الى اللتر من المحلول المستقبل .

ملحوظة هامة : يمكن تقدير كل من الصوديوم والبوتاسيوم والكلوريد والبيكربونات في تجربة واحدة . وهنا يستفاد من السائل المستخدم لتقدير الصوديوم والبوتاسيوم فبدلا من الذهاب الى البالوعة يمكن استخدام النموذج المحمض الناتج من التحال لتقدير البيكربونات ، المحلول المستقبل من جزء (T) المغذي لجهاز قياسي ضوء اللهب لتقدير الكلوريد .



رسم توضيحي لطريقة تقدير الشوارد المختلفة في بلازما الدم بجهاز التحليل الذاتي

واساس الطرق السابقة هي التي تطبق هنا . كما ان المحاليل هي بذاتها كما هي في الاجهزة ذات الخلية المفتوحة مع تغير في المحاليل القياسية . فالاخيرة ثابتة بالنسبة للصوديوم والبوتاسيوم والبيكربونات ويضاف اليها محلول قياسي من كلوريد الامونيوم (تركيز 1000 مللي مكافىء/اللتر) ويحضر بذوبان (53.5) غرام من كلوريد الامونيوم في الماء حتى حجم اللتر .

المحاليل القياسية العاملة والتي تحتوي على الصوديوم والبوتاسيوم والبيكربونات والكلوريد تحضر كما يلي : –

ملل لتر من القياسي المخزون/(100) مللى لتر						المحتوى بالمللى مكافئ/اللتر	
NH_4Cl	Na_2CO_3	KCl	NaCl	CO_2	Cl	K	Na
2.5	5.0	7.0	9.0	10	122	7	110
2.0	8.0	6.0	8.8	16	114	6	120
1.5	11.0	5.0	8.6	22	106	5	130
1.0	14.0	4.0	8.4	28	98	4	140
0.5	17.0	3.0	8.2	34	90	3	150
–	20.0	2.0	8.0	40	82	2	160
–	2	8.0	9.2	4	100	8	100
–	23	1.0	7.8	46	79	1	170
–	–	–	7.0	–	70	–	70

جداول تحويل الوحدات

الاعتيادية الى الوحدات العالمية

البيليروبين في البلازما أو المصل .

ملغم/100 مللي لتر	مايكرومول/لتر	ملغم/100 مللي لتر	مايكرومول/لتر	ملغم/100 مللي لتر	مايكرومول/لتر
0.1	1.71	1.6	27.4	13.0	222
0.2	3.42	1.7	29.1	14.0	239
0.3	5.13	1.8	30.8	15.0	256
0.4	6.84	1.9	32.5	16.0	279
0.5	8.55	2.0	34.2	17.0	291
0.6	10.3	3.0	51.3	18.0	308
0.7	12.0	4.0	68.4	19.0	325
0.8	13.7	5.0	85.5	20.0	342
0.9	15.4	6.0	103	21.0	359
1.0	17.1	7.0	120	22.0	376
1.1	18.8	8.0	137	23.0	393
1.2	20.5	9.0	154	24.0	410
1.3	22.2	10.0	171	25.0	428
1.4	23.9	11.0	188		
1.5	25.6	12.0	205		

مايكرومول/لتر	ملغم/100 مللي لتر	مايكرومول/لتر	ملغم/100 مللي لتر	مايكرومول/لتر	ملغم/100 مللي لتر
1	0.058	15	0.877	29	1.70
2	0.117	16	0.935	30	1.76
3	0.175	17	0.994	40	2.34
4	0.234	18	1.05	60	3.51
5	0.292	19	1.11	80	4.68
6	0.351	20	1.17	100	5.85
7	0.409	21	1.23	120	7.02
8	0.468	22	1.29	140	8.19
9	0.526	23	1.34	160	9.35
10	0.585	24	1.40		
11	0.643	25	1.46		
12	0.702	26	1.52		
13	0.760	27	1.58		
14	0.819	28	1.64		

الكالسيوم (II) في البلازما أو المصل .

ملغم/100 ملي لتر	ملي مول/لتر	ملغم/100 ملي لتر	ملي مول/لتر	ملغم/100 ملي لتر	ملي مول/لتر
2.0	0.499	7.0	1.75	12.0	2.99
2.5	0.624	7.5	1.87	12.5	3.12
3.0	0.748	8.0	2.00	13.0	3.24
3.5	0.873	8.5	2.12	13.5	3.37
4.0	0.998	9.0	2.24	14.0	3.49
4.5	1.12	9.5	2.37		
5.0	1.25	10.0	2.50		
5.5	1.37	10.5	2.62		
6.0	1.50	11.0	2.74		
6.5	1.62	11.5	2.87		

ملي مول/لتر	ملغم/100 ملي لتر	ملي مول/لتر	ملغم/100 ملي لتر	ملي مول/لتر	ملغم/100 ملي لتر
0.5	2.00	1.5	6.1	2.8	11.2
0.6	2.40	1.6	6.41	2.9	11.6
0.7	2.80	1.7	6.81	3.0	12.0
0.8	3.21	1.8	7.21	3.1	12.4
0.9	3.61	1.9	7.62	3.2	12.8
1.0	4.01	2.0	8.02	3.3	13.2
1.1	4.41	2.1	8.42	3.4	13.6
1.2	4.81	2.2	8.82	3.5	14.0
1.3	5.21	2.3	9.22		
1.4	5.61	2.4	9.62		
		2.5	10.0		
		2.6	10.4		
		2.7	10.8		

الكالسيوم (II) في بول (24) ساعة

مللي غرام	مللي مول	مللي غرام	مللي مول	مللي غرام	مللي مول
5	0.125	260	6.49	560	14.0
10	0.250	280	6.99	580	14.5
15	0.374	300	7.48	600	15.0
20	0.499	320	7.98		
40	0.998	340	8.48		
60	1.50	360	8.98		
80	2.00	380	9.48		
100	2.50	400	9.98		
120	2.99	420	10.5		
140	3.49	440	11.0		
160	3.99	460	11.5		
180	4.49	480	12.0		
200	4.99	500	12.5		
220	5.49	520	13.0		
240	5.99	540	13.5		

مللي مول	مللي غرام	مللي مول	مللي غرام	مللي مول	مللي غرام
0.5	20.0	7.0	280	13.5	541
1.0	40.1	7.5	301	14.0	561
1.5	60.1	8.0	321	14.5	581
2.0	80.2	8.5	341	15.0	601
2.5	100	9.0	361		
3.0	120	9.5	381		
3.5	140	10.0	401		
4.0	160	10.5	421		
4.5	180	11.0	441		
5.0	200	11.5	461		
5.5	220	12.0	481		
6.0	240	12.5	501		
6.5	260	13.0	521		

الكولسترول في البلازما أو المصل

ملي غرام/ 100 ملي لتر	ملي مول/لتر	ملي غرام/ 100 ملي لتر	ملي مول/ل
20	0.517	300	7.76
40	1.03	320	8.28
60	1.55	340	8.79
80	2.07	360	9.31
100	2.59	380	9.83
120	3.10	400	10.3
140	3.62	420	10.9
160	4.14	440	11.4
180	4.65	460	11.9
200	5.17	480	12.4
220	5.69	500	12.9
240	6.21	520	13.4
260	6.72	540	14.0
280	7.24	560	14.5
		580	15.0
		600	15.5
		620	16.0
		640	16.6

ملي مول/لتر	ملي غرام/ 100 ملي لتر	ملي مول/لتر	ملي غرام/ 100 ملي لتر	ملي مول/لتر	ملي غرام/ 100 ملي لتر
1.0	38.7	7.5	290	14.0	541
1.5	58.0	8.0	309	14.5	561
2.0	77.3	8.5	329	15.0	580
2.5	96.7	9.0	348	15.5	599
3.0	116	9.5	367	16.0	619
3.5	135	10.0	387	16.5	638
4.0	155	10.5	406	17.0	657
4.5	174	11.0	425	17.5	677
5.0	193	11.5	445	18.0	696
5.5	213	12.0	464		
6.0	232	12.5	483		
6.5	251	13.0	503		
7.0	271	13.5	522		

الكرياتنين في البلازما أو المصل .

ملي غرام/ 100 ملي لتر	مايكرومول/لتر	ملي غرام/ 100 ملي لتر	مايكرومول/لتر	ملي غرام/ 100 ملي لتر	مايكرومول/لتر
0.25	22.1	4.25	376	8.00	707
0.50	44.2	4.50	398	8.25	729
0.75	66.3	4.75	420	8.50	751
1.00	88.4	5.00	442	8.75	774
1.25	110	5.25	464	9.0	796
1.50	133	5.50	486	9.25	818
1.75	155	5.75	508	9.50	840
2.00	177	6.00	530	9.75	862
2.25	199	6.25	552	10.0	884
2.50	221	6.50	575	10.25	906
2.75	243	6.75	597	10.5	928
3.00	265	7.00	619	10.75	950
3.25	287	7.25	641	11.0	972
3.50	309	7.50	663	11.25	994
3.75	332	7.75	685	11.5	1020
4.00	354			11.75	1040
				12.0	1060

مايكرومول/لتر	ملي غرام/ 100 ملي لتر	مايكرومول/لتر	ملي غرام/ 100 لتر	مايكرومول/لتر	ملي غرام/ 100 ملي لتر mg/DL
20	0.226	260	2.94	500	5.66
40	0.452	280	3.17	520	5.88
60	0.679	300	3.39	540	6.11
80	0.905	320	3.62	560	6.33
100	1.13	340	3.85	580	6.56
120	1.36	360	4.07	600	6.79
140	1.58	380	4.30	620	7.01
160	1.81	400	4.52	640	7.24

7.46	660	4.75	420	2.04	180
7.69	680	4.98	440	2.26	200
8.14	720	5.20	460	2.49	220
8.37	740	5.43	480	2.71	240

ملي غرام/ 100 ملي لتر	مايكرومول/لتر
8.60	760
8.82	780
9.05	800
9.28	820
9.50	840
9.73	860
9.95	880
10.2	900
10.4	920
10.6	940
10.8	960
11.1	980
11.3	1000

سكر الكلوكوز في البلازما أو المصل أو السائل الشوكي

ملغم/100 ملي لتر	ملي مول/لتر	ملغم/100 ملي لتر	ملي مول/لتر	ملغم/100 ملي لتر	ملي مول/لتر
10	0.555	160	8.88	310	17.2
20	1.11	170	9.44	320	17.8
30	1.66	180	9.99	330	18.3
40	2.22	190	10.5	340	18.9
50	2.78	200	11.1	350	19.4
60	3.33	210	11.6	360	20.0
70	3.88	220	12.2	370	20.5
80	4.44	230	12.8	380	21.1
90	5.00	240	13.3	390	21.6
100	5.55	250	13.9	400	22.2
110	6.10	260	14.4	410	22.8
120	6.66	270	15.0	420	23.3
130	7.22	280	15.5	430	23.9
140	7.77	290	16.1	440	24.4
150	8.33	300	16.6	450	25.0
				460	25.5
				470	26.1
				480	26.6
				490	27.2
				500	27.8

ملي مول/لتر	ملغم/100 ملي لتر	ملي مول/لتر	ملغم/100 ملي لتر	ملي مول/لتر	ملغم/100 ملي لتر
0.5	9.01	5.5	99.1	10.5	189
1.0	18.0	6.0	108	11.0	198
1.5	27.0	6.5	117	11.5	207
2.0	36.0	7.0	126	12.0	216
2.5	45.0	7.5	135	12.5	225
3.0	54.0	8.0	144	13.0	234
3.5	63.0	8.5	153	13.5	243
4.0	72.1	9.0	162	14.0	252
4.5	81.1	9.5	171	14.5	261
5.0	90.1	10.0	180	15.0	270

ملي مول/لتر	ملغم/100 ملي لتر
15.5	279
16.0	288
16.5	297
17.0	306
17.5	315
18.0	324
18.5	333
19.0	342
19.5	351
20.0	360
21.0	378
21.5	387
22.0	396
22.5	405
23.0	414
23.5	423
24.0	432
24.5	441
25.0	450

الحديد (III) (المرتبط بالترانسفيرين) في البلازما او المصل .

مايكروغرام/ 100 ملي لتر	ميكرومول/لتر	مايكروغرام/ 100 ملي لتر	مايكرومول/لتر	مايكروغرام/ 100 ملي لتر	ميكرومول/لتر
10	1.79	170	30.4	330	59.1
20	3.58	180	32.2	340	60.9
30	5.37	190	34.0	350	62.7
40	7.16	200	35.8	360	64.5
50	8.95	210	37.6	370	66.2
60	10.7	220	39.4	380	68.0
70	12.5	230	41.2	390	69.8
80	14.3	240	43.0	400	71.6
90	16.1	250	44.8	410	73.4
100	17.9	260	46.6	420	75.2
110	19.7	270	48.3		
120	21.5	280	50.1		
130	23.3	290	51.9		
140	25.1	300	53.7		
150	26.8	310	55.5		
160	28.6	320	57.3		

مايكرومول/لتر	مايكروغرام/ 100 ملي لتر	ميكرومول/لتر	مايكروغرام/ 100 ملي لتر	مايكرومول/لتر	مايكروغرام/ 100 ملي لتر
2	11.2	28	156	54	302
4	22.3	30	168	56	313
6	33.5	32	179	58	324
8	44.7	34	190	60	335
10	55.8	36	201	62	346
12	67.0	38	212	64	357
14	78.2	40	223	66	368
16	89.4	42	234	68	380
18	100	44	246	70	391
20	112	46	257	72	402
22	123	48	268	74	413
24	134	50	279		
26	145	52	290		

الفوسفات (الغير عضوي) في البلازما أو المصل

ملغم/100 ملي لتر	ملي مول/لتر	ملي مول/لتر	ملغم/100 ملي لتر
1.24	0.4	0.161	0.50
1.55	0.5	0.323	1.00
1.86	0.6	0.484	1.50
2.17	0.7	0.646	2.00
2.48	0.8	0.807	2.50
2.79	0.9	0.968	3.00
3.10	1.0	1.13	3.50
3.41	1.1	1.29	4.00
3.72	1.2	1.45	4.50
4.03	1.3	1.61	5.00
4.34	1.4	1.78	5.50
4.65	1.5	1.94	6.00
4.96	1.6	2.10	6.50
5.26	1.7	2.26	7.00
5.58	1.8	2.42	7.50
5.88	1.9	2.58	8.00
6.19	2.0	2.74	8.50
6.50	2.1	2.90	9.00
6.81	2.2	3.07	9.50
7.12	2.3	3.23	10.0
7.43	2.4	3.4	10.5
7.74	2.5	3.6	11.0
8.05	2.6		
8.36	2.7		
8.67	2.8		
8.98	2.9		
9.29	3.0		
9.60	3.1		
9.91	3.2		
10.2	3.3		
10.5	3.4		
10.8	3.5		
11.15	3.6		

حامض البوليك في البلازما أو المصل .

ملغم/100 ملي لتر	مايكرومول/لتر	ملغم/100 ملي لتر	مايكرومول/لتر
1.0	59.5	17.5	1040
1.5	89.2	18.0	1070
2.0	119	18.5	1100
2.5	149	19.0	1130
3.0	178	19.5	1160
3.5	208	20.0	1190
4.0	238	20.5	1220
4.5	268	21.0	1250
5.0	297	21.5	1279
5.5	327	22.0	1309
6.0	357		
6.5	387		
7.0	416		
7.5	446		
8.0	476		
8.5	506		
9.0	535		
9.5	565		
10.0	595		
10.5	625		
11.0	654		
12.0	714		
12.5	744		
13.0	773		
13.5	803		
14.0	833		
14.5	862		
15.0	892		
15.5	922		
16.0	952		
16.5	981		
17.0	1010		

ميكرومول/لتر	ملغم/100 ملي لتر	ميكرومول/لتر	ملغم/100 ملي لتر
50	0.840	475	7.98
75	1.26	500	8.40
100	1.68	525	8.82
125	2.10	550	9.25
150	2.52	575	9.67
175	2.94	600	10.1
200	3.36	625	10.5
225	3.78	650	10.9
250	4.20	675	11.3
275	4.62	700	11.8
300	5.4	725	12.2
325	5.46	750	12.6
350	5.88	775	13.0
375	6.30	800	13.4
400	6.72	825	13.9
425	7.14	850	14.3
450	7.56	875	14.7
		900	15.1

اليوريا في البلازما أو المصل

اليوريا ن ملغم/100 ملي لتر	اليوريا ملي مول/لتر	اليوريا ن ملغم/100 ملي لتر	اليوريا ملي مول/لتر
5	1.78	75	26.8
10	3.57	80	28.6
15	5.36	85	30.3
20	7.14	90	32.1
25	8.92	95	33.9
30	10.7	100	35.7
35	12.5	105	37.5
40	14.3	110	39.3
45	16.1	115	41.0
50	17.8	120	42.8
55	19.6	125	44.6
60	21.4	130	46.4
65	23.2	135	48.2
70	25.0	140	50.0
		145	51.8
		150	53.6

اليوريا ملي مول/لتر	اليوريا ملغم/100 ملي لتر	اليوريا ن ملغم/100 ملي لتر	ملي مول/لتر	ملغم/100 ملي لتر	اليوريا ن ملغم/100 ملي لتر
1	6.00	2.80	20	120	56.0
2	12.0	5.60	21	126	58.8
3	18.0	8.40	22	132	61.6
4	24.0	11.2	23	138	64.4
5	30.0	14.0	24	144	67.2
6	36.0	16.8	25	150	70.0
7	42.0	19.6	26	156	72.8
8	48.0	22.4	27	162	75.6
9	54.0	25.2	28	168	78.4
10	60.0	28.0	29	174	81.2
11	66.1	30.8	30	180	84.0
12	72.1	33.6	31	186	86.8
13	78.1	36.4	32	192	84.6
14	84.1	39.2	33	198	92.4
15	90.1	42.0	34	204	95.2
16	96.1	44.8	35	210	98.0
17	102	47.6	36	216	101
18	108	50.4	37	222	104
19	114	53.2	38	228	106
			39	234	109
			40	240	112
			41	246	115
			42	252	118
			43	258	120
			44	264	123
			45	270	126
			46	276	129
			47	282	132
			48	288	134
			49	294	137
			50	300	140

الكرياتينين في بول (24) ساعة

ملي غرام	ملي مول	ملي غرام	ملي مول
100	0.884	2200	19.4
200	1.77	2300	20.3
300	2.65		
400	3.54		
500	4.42		
600	5.30		
700	6.19		
800	7.07		
900	7.96		
1000	8.84		
1100	9.72		
1200	10.6		
1300	11.5		
1400	12.4		
1500	13.3		
1600	14.1		
1700	15.0		
1800	15.9		
1900	16.8		
2000	17.7		
2100	18.6		

ملي مول	ملي غرام	ملي مول	ملي غرام	ملي مول	ملي غرام
1.0	113	9.0	1020	18.0	2040
2.0	226	10.0	1130	19.0	2150
3.0	339	11.0	1240		
4.0	452	12.0	1360		
5.0	566	13.0	1470		
6.0	679	14.0	1580		
7.0	792	15.0	1700		
8.0	905	16.0	1810		
		17.0	1920		

الترايكلسريد في البلازما أو المصل (على الصورة تراي أوليييت الكليسيرول)

ملغم/100 ملي لتر	ملي مول/لتر	ملغم/100 ملي لتر	ملي مول/لتر
100	1.13	1500	16.9
200	2.26	1600	18.1
300	3.39	1700	19.2
400	4.52	1800	20.3
500	5.65	1900	21.4
600	6.78	2000	22.6
700	7.90	2100	23.7
800	9.03	2200	24.8
900	10.2	2300	26.0
1000	11.3	2400	27.1
1100	12.4	2500	28.2
1200	13.6	2600	29.4
1300	14.7	2700	30.5
1400	15.8	2800	31.6

ملي مول/لتر	ملغم/100 ملي لتر	ملي مول/لتر	ملغم/100 ملي لتر	ملي مول/لتر	ملغم/100 ملي لتر
1	88.5	16	1420	31	2740
2	177	17	1500	32	2830
3	266	18	1590	33	2920
4	354	19	1680	34	3010
5	443	20	1770	35	3100
6	531	21	1860		
7	620	22	1950		
8	708	23	2040		
9	797	24	2120		
10	885	25	2210		
11	974	26	2300		
12	1060	27	2390		
13	1150	28	2480		
14	1240	29	2570		
15	1330	30	2660		

الأدلة الحمضة والقاعدية
ACID–BASE INDICATORS

INDICATOR	pH RANGE	QUANTITY OF INDICATOR PER 10 ML.	COLOR	
			Acid	Alkaline
Thymol blue (A)*†	1.2–2.8	1-2 drops 0.1% soln. in aq.	red	yellow
Methyl orange (B)	3.1–4.4	1 drop 0.1% soln. in aq.	red	orange
Bromphenol blue (A)†	3.0–4.6	1 drop 0.1% soln. in aq.	yellow	blue-violet
Bromcresol green (A)†	4.0–5.6	1 drop 0.1% soln. in aq.	yellow	blue
Methyl red (A)†	4.4–6.2	1 drop 0.1% soln. in aq.	red	yellow
Bromcresol purple (A)†	5.2–6.8	1 drop 0.1% soln. in aq.	yellow	purple
Bromthymol blue (A)†	6.2–7.6	1 drop 0.1% soln. in aq.	yellow	blue
Phenol red (A)†	6.4–8.0	1 drop 0.1% soln. in aq.	yellow	red
Neutral red (B)	6.8–8.0	1 drop 0.1% soln. in 70% alc.	red	yellow
Thymol blue (A)†‡	8.0–9.6	1-5 drops 0.1% soln. in aq.	yellow	blue
Phenolphthalein (A)	8.0–10.0	1-5 drops 0.1% soln. in 70% alc.	colorless	red
Thymolphthalein (A)	9.4–10.6	1 drop 0.1% soln. in 90% alc.	colorless	blue

* للمدى الحمضي

+ ملح الصوديوم

+ للمدى القلوي

ان الحرف B, A بين قوسين بعد اسم الدليل يشير الى الحمض (Acid) وقاعدي (Base)

الاحماض والقلويات شائعة الاستخدام
COMMONLY USED ACIDS AND ALKALIES*

SOLUTION	MOL. WEIGHT	SPEC. GRAVITY*	G.M. PER LITER*	MOLARITY*	NORMALITY*	APPROX. NUMBER OF ML. REQUIRED TO MAKE 1000 ML. OF 1 N SOLUTION
Conc. HCl	36.46	1.19	440	12	12	83
Conc. H_2SO_4	98.08	1.84	1730	18	36	28
Conc. HNO_3	63.02	1.42	990	16	16	64
Conc. lactic acid	90.08	1.21	1030	11	11	87
Glacial acetic acid	60.08	1.06	1060	17.5	17.5	57
Conc. NH_4OH	35.05	0.90	250	15	15	67

جدول تحويل درجات الحرارة

CENTIGRADE		FAHRENHEIT
110°	....	230°
100	....	212
95	....	203
90	....	194
85	....	185
80	....	176
75	....	167
70	....	158
65	....	149
60	....	140
55	....	131
50	....	122
45	....	113
44	....	111.2
43	....	109.4
42	....	107.6
41	....	105.8
40.5	....	104.9
40	....	104
39.5	....	103.1
39	....	102.2
38.5	....	101.3
38	....	100.4
37.5	....	99.5
37°	....	98.6°
36.5	....	97.7
36	....	96.8
35.5	....	95.9
35	....	95
34	....	93.2
33	....	91.4
32	....	89.6
31	....	87.8
30	....	86
25	....	77
20	....	68
15	....	59
10	....	50
+5	....	41
0	....	32
−5	....	23
−10	....	14
−15	....	+5
−20	....	−4
0.54°	=	1°
1°	=	1.8°

لتحويل الفهرنهايت الى مئوي نطرح ٣٢ ثم نضرب في **0.555** لتحويل المئوي الى الفهرنهايت نضرب في **1.8** ثم نضيف **32**

تحويلات النظام المتري

1 meter (m.) = 0.001 kilometer (km.)
= 10 decimeters (dm.)
= 100 centimeters (cm.)
= 1000 millimeters (mm.)
1 micron (μ) = m. × 10^{-6} = cm. × 10^{-4}
1 nanometer (nm.) = 1 millimicron (mμ)* = m. × 10^{-9}
= cm. × 10^{-7}
1 Angstrom (A)* = m. × 10^{-10} = cm. × 10^{-8}
1 gram (gm.) = 0.001 kilogram (kg.)
= 1000 milligrams (mg.)
1 gamma (γ)* = 1 microgram (μg.) = gm. × 10^{-6} = mg. × 10^{-3}
1 nanogram (ng.) = gm. × 10^{-9}
1 picogram (pg.) = gm. × 10^{-12}
1 liter (l) = 10 deciliters (dl.)
= 1000 milliliters (ml.)
1 lambda (λ)* = 1 microliter (μl.) = liters × 10^{-6} = ml. × 10^{-3}
1 meter = 39.37 inches
1 liter = 1.057 liquid quarts
1 kilogram = 2.205 pounds (avoirdupois)
1 inch = 2.540 centimeters
1 pound (avoirdupois) = 453.6 grams

النظام العالمي للوحدات (S.I) والكميات

MULTIPLE	PREFIX	SYMBOL	MULTIPLE	PREFIX	SYMBOL
10^{12}	tera	T	10^{-1}	deci	d
10^{9}	giga	G	10^{-2}	centi	c
10^{6}	mega	M	10^{-3}	milli	m
10^{3}	kilo	k	10^{-6}	micro	μ
10^{2}	hecto	h	10^{-9}	nano	n
10	deca	da	10^{-12}	pico	p
			10^{-15}	femto	f
			10^{-18}	alto	a

ان النظام العالمي للوحدات (S.I) وهو محاولة للوصول الى تعميم بين النظم العلميــة في تعريف نتـائج التجارب . والنظام منبثق عن الكلية الملكية للباثولوجيا والمنشورة في jclin chem 23,818,1970

الاوزان الذرية للعناصر شائعة الاستخدام في مجال الكيمياء السريرية

	SYMBOL	ATOMIC NUMBER	ATOMIC WEIGHT
Aluminum	Al	13	26.982
Antimony	Sb	51	121.75
Arsenic	As	33	74.912
Barium	Ba	56	137.34
Beryllium	Be	4	9.0122
Bismuth	Bi	83	208.98
Boron	B	5	10.811
Bromine	Br	35	79.909
Cadmium	Cd	48	112.40
Calcium	Ca	20	40.08
Carbon	C	6	12.011
Chlorine	Cl	17	35.453
Chromium	Cr	24	51.996
Cobalt	Co	27	58.933
Copper	Cu	29	63.54
Fluorine	F	9	18.998
Gold	Au	79	196.97
Hydrogen	H	1	1.0080
Iodine	I	53	126.90
Iron	Fe	26	55.847
Lead	Pb	82	207.19
Lithium	Li	3	6.939
Magnesium	Mg	12	24.312
Manganese	Mn	25	54.938
Mercury	Hg	80	200.59
Molybdenum	Mo	42	95.94
Nickel	Ni	28	58.71
Nitrogen	N	7	14.007
Oxygen	O	8	15.999
Phosphorus	P	15	30.974
Potassium	K	19	39.102
Selenium	Se	34	78.96
Silicon	Si	14	28.086
Silver	Ag	47	107.87
Sodium	Na	11	22.990
Strontium	Sr	38	87.62
Sulfur	S	16	32.064
Thallium	Tl	81	204.37
Tin	Sn	50	118.69
Tungsten	W	74	183.85
Zinc	Zn	30	65.37

1b	2b	3a	4a	5a	6a	7a	0	Orbit
							2 0 He 4.00260 2	-K
		5 +3 B 10.81 2-3	6 +2 +4 -4 C 12.011 2-4	7 +1 +2 +3 +4 +5 -1 -2 -3 N 14.0067 2-5	8 -2 O 15.9994 2-6	9 -1 F 18.9984 2-7	10 0 Ne 20.179 2-8	-K-L
Transition Elements		13 +3 Al 26.9815 2-8-3	14 +2 +4 -4 Si 28.086 2-8-4	15 +3 +5 -3 P 30.9738 2-8-5	16 +4 +6 -2 S 32.06 2-8-6	17 +1 +5 +7 -1 Cl 35.453 2-8-7	18 0 Ar 39.948 2-8-8	-K-L-M
[illegible] +1 +2 [illegible]u [illegible]546 [illegible] 18-1	30 +2 Zn 65.38 -8-18-2	31 +3 Ga 69.72 -8-18-3	32 +2 +4 Ge 72.59 -8-18-4	33 +3 +5 -3 As 74.9216 -8-18-5	34 +4 +6 -2 Se 78.96 -8-18-6	35 +1 +5 -1 Br 79.904 -8-18-7	36 0 Kr 83.80 -8-18-8	-L-M-N
47 +1 Ag [illegible] 868 [illegible]-18-1	48 +2 Cd 112.40 -18-18-2	49 +3 In 114.82 -18-18-3	50 +2 +4 Sn 118.69 -18-18-4	51 +3 +5 -3 Sb 121.75 -18-18-5	52 +4 +6 -2 Te 127.60 -18-18-6	53 +1 +5 +7 -1 I 126.9045 -18-18-7	54 0 Xe 131.30 -18-18-8	-M-N-O
[illegible] +1 +3 [illegible]u [illegible].9665 [illegible] 18-1	80 +1 +2 Hg 200.59 -32-18-2	81 +1 +3 Tl 204.37 -32-18-3	82 +2 +4 Pb 207.2 -32-18-4	83 +3 +5 Bi 208.9806 -32-18-5	84 +2 +4 Po (209) -32-18-6	85 At (210) -32-18-7	86 0 Rn (222) -32-18-8	-N-O-P
								-O-P-Q

66 +3 Dy [illegible]2.50 -28-8-2	67 +3 Ho 164.9303 -29-8-2	68 +3 Er 167.26 -30-8-2	69 +3 Tm 168.9342 -31-8-2	70 +2 +3 Yb 173.04 -32-8-2	71 +3 Lu 174.97 -32-9-2	-N-O-P
[illegible] +3 Cf (251) -28-8-2	99 Es (254) -29-8-2	100 Fm (257) -30-8-2	101 Md (256) -31-8-2	102 No (254) -32-8-2	103 Lr -32-9-2	-O-P-Q

PERIODIC TABLE OF THE ELEMENTS

الجدول الدوري

PERIODIC TABLE

KEY TO CHART

Atomic Number →	50 +2	← Oxidation States
Symbol →	Sn +4	
Atomic Weight →	118.69	
	-18-18-4	← Electron Configuration

Transition Elements (3b–8); Group 8 (Fe, Co, Ni columns)

1a	2a	3b	4b	5b	6b	7b	8		
1 +1 -1 H 1.0080 1									
3 +1 Li 6.94_1 2-1	4 +2 Be 9.01218 2-2								
11 +1 Na 22.9898 2-8-1	12 +2 Mg 24.305 2-8-2								
19 +1 K 39.102 -8-8-1	20 +2 Ca 40.08 -8-8-2	21 +3 Sc 44.9559 -8-9-2	22 +2 +3 +4 Ti 47.90 8-10-2	23 +2 +3 +4 +5 V 50.941_4 -8-11-2	24 +2 +3 +6 Cr 51.996 -8-13-1	25 +2 +3 +4 +7 Mn 54.9380 -8-13-2	26 +2 +3 Fe 55.847 -8-14-2	27 +2 +3 Co 58.9332 -8-15-2	28 +2 +3 Ni 58.71 -8-16-2
37 +1 Rb 85.467_8 -18-8-1	38 +2 Sr 87.62 -18-8-2	39 +3 Y 88.9059 18-9-2	40 +4 Zr 91.22 -18-10-2	41 +3 +5 Nb 92.9064 -18-12-1	42 +6 Mo 95.94 -18-13-1	43 +4 +6 +7 Tc 98.9062 -18-13-2	44 +3 Ru 101.07 -18-15-1	45 +3 Rh 102.9055 -18-16-1	46 +2 +4 Pd 106.4 -18-18-0
55 +1 Cs 132.9055 -18-8-1	56 +2 Ba 137.34 -18-8-2	57* +3 La 138.9055 -18-9-2	72 +4 Hf 178.49 -32-10-2	73 +5 Ta 180.947_9 -32-11-2	74 +6 W 183.85 -32-12-2	75 +4 +6 +7 Re 186.2 -32-13-2	76 +3 +4 Os 190.2 -32-14-2	77 +3 +4 Ir 192.22 -32-15-2	78 +2 +4 Pt 195.09 -32-16-2
87 +1 Fr (223) -18-8-1	88 +2 Ra (226) -18-8-2	89** +3 Ac (227) -18-9-2	104 — -32-10-2	105 —					

*Lanthanides	58 +3 +4 Ce 140.12 -20-8-2	59 +3 Pr 140.9077 -21-8-2	60 +3 Nd 144.24 -22-8-2	61 +3 Pm (145) -23-8-2	62 +2 +3 Sm 150.4 -24-8-2	63 +2 +3 Eu 151.96 -25-8-2	64 +3 Gd 157.25 -25-9-2	65 +3 Tb 158.9254 -27-8-2
**Actinides	90 +4 Th 232.0381 -18-10-2	91 +5 +4 Pa 231.0359 -20-9-2	92 +3 +4 +5 +6 U 238.029 -21-9-2	93 +3 +4 +5 +6 Np 237.0482 -22-9-2	94 +3 +4 +5 +6 Pu (244) -24-8-2	95 +3 +4 +5 +6 Am (243) -25-8-2	96 +3 Cm (247) -25-9-2	97 +3 +4 Bk (247) -27-8-2

Numbers in parentheses are mass numbers of most stable isotope of that element.

From Weast, R. C. (ed.): Handbook of Chemistry and Physics. 54th ed. Cleveland, Ohio, Chemical Rubber Co., 1973-1974.

PLACE LOGARITHMS

جدول اللوغارتيمات

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1.0	.0000	.0043	.0086	.0128	.0170	.0212	.0253	.0294	.0334	.0374
1.1	.0414	.0453	.0492	.0531	.0569	.0607	.0645	.0682	.0719	.0755
1.2	.0792	.0828	.0864	.0899	.0934	.0969	.1004	.1038	.1072	.1106
1.3	.1139	.1173	.1206	.1239	.1271	.1303	.1335	.1367	.1399	.1430
1.4	.1461	.1492	.1523	.1553	.1584	.1614	.1644	.1673	.1703	.1732
1.5	.1761	.1790	.1818	.1847	.1875	.1903	.1931	.1959	.1987	.2014
1.6	.2041	.2068	.2095	.2122	.2148	.2175	.2201	.2227	.2253	.2279
1.7	.2304	.2330	.2355	.2380	.2405	.2430	.2455	.2480	.2504	.2529
1.8	.2553	.2577	.2601	.2625	.2648	.2672	.2695	.2718	.2742	.2765
1.9	.2788	.2810	.2833	.2856	.2878	.2900	.2923	.2945	.2967	.2989
2.0	.3010	.3032	.3054	.3075	.3096	.3118	.3139	.3160	.3181	.3201
2.1	.3222	.3243	.3263	.3284	.3304	.3324	.3345	.3365	.3385	.3404
2.2	.3424	.3444	.3464	.3483	.3502	.3522	.3541	.3560	.3579	.3598
2.3	.3617	.3636	.3655	.3674	.3692	.3711	.3729	.3747	.3766	.3784
2.4	.3802	.3820	.3838	.3856	.3874	.3892	.3909	.3927	.3945	.3962
2.5	.3979	.3997	.4014	.4031	.4048	.4065	.4082	.4099	.4116	.4133
2.6	.4150	.4166	.4183	.4200	.4216	.4232	.4249	.4265	.4281	.4298
2.7	.4314	.4330	.4346	.4362	.4378	.4393	.4409	.4425	.4440	.4456
2.8	.4472	.4487	.4502	.4518	.4533	.4548	.4564	.4579	.4594	.4609
2.9	.4624	.4639	.4654	.4669	.4683	.4698	.4713	.4728	.4742	.4757
3.0	.4771	.4786	.4800	.4814	.4829	.4843	.4857	.4871	.4886	.4900
3.1	.4914	.4928	.4942	.4955	.4969	.4983	.4997	.5011	.5024	.5038
3.2	.5051	.5065	.5079	.5092	.5105	.5119	.5132	.5145	.5159	.5172
3.3	.5185	.5198	.5211	.5224	.5237	.5250	.5263	.5276	.5289	.5302
3.4	.5315	.5328	.5340	.5353	.5366	.5378	.5391	.5403	.5416	.5428
3.5	.5441	.5453	.5465	.5478	.5490	.5502	.5514	.5527	.5539	.5551
3.6	.5563	.5575	.5587	.5599	.5611	.5623	.5635	.5647	.5658	.5670
3.7	.5682	.5694	.5705	.5717	.5729	.5740	.5752	.5763	.5775	.5786
3.8	.5798	.5809	.5821	.5832	.5843	.5855	.5866	.5877	.5888	.5899
3.9	.5911	.5922	.5933	.5944	.5955	.5966	.5977	.5988	.5999	.6010
4.0	.6021	.6031	.6042	.6053	.6064	.6075	.6085	.6096	.6107	.6117
4.1	.6128	.6138	.6149	.6160	.6170	.6180	.6191	.6201	.6212	.6222
4.2	.6232	.6243	.6253	.6263	.6274	.6284	.6294	.6304	.6314	.6325
4.3	.6335	.6345	.6355	.6365	.6375	.6385	.6395	.6405	.6415	.6425
4.4	.6435	.6444	.6454	.6464	.6474	.6484	.6493	.6503	.6513	.6522
4.5	.6532	.6542	.6551	.6561	.6571	.6580	.6590	.6599	.6609	.6618
4.6	.6628	.6637	.6646	.6656	.6665	.6675	.6684	.6693	.6702	.6712
4.7	.6721	.6730	.6739	.6749	.6758	.6767	.6776	.6785	.6794	.6803
4.8	.6812	.6821	.6830	.6839	.6848	.6857	.6866	.6875	.6884	.6893
4.9	.6902	.6911	.6920	.6928	.6937	.6946	.6955	.6964	.6972	.6981
5.0	.6990	.6998	.7007	.7016	.7024	.7033	.7042	.7050	.7059	.7067
5.1	.7076	.7084	.7093	.7101	.7110	.7118	.7126	.7135	.7143	.7152
5.2	.7160	.7168	.7177	.7185	.7193	.7202	.7210	.7218	.7226	.7235
5.3	.7243	.7251	.7259	.7267	.7275	.7284	.7292	.7300	.7308	.7316
5.4	.7324	.7332	.7340	.7348	.7356	.7364	.7372	.7380	.7388	.7396

TABLE OF FOUR

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
5.5	.7404	.7412	.7419	.7427	.7435	.7443	.7451	.7459	.7466	.7474
5.6	.7482	.7490	.7497	.7505	.7513	.7520	.7528	.7536	.7543	.7551
5.7	.7559	.7566	.7574	.7582	.7589	.7597	.7604	.7612	.7619	.7627
5.8	.7634	.7642	.7649	.7657	.7664	.7672	.7679	.7686	.7694	.7701
5.9	.7709	.7716	.7723	.7731	.7738	.7745	.7752	.7760	.7767	.7774
6.0	.7782	.7789	.7796	.7803	.7810	.7818	.7825	.7832	.7839	.7846
6.1	.7853	.7860	.7868	.7875	.7882	.7889	.7896	.7903	.7910	.7917
6.2	.7924	.7931	.7938	.7945	.7952	.7959	.7966	.7973	.7980	.7987
6.3	.7993	.8000	.8007	.8014	.8021	.8028	.8035	.8041	.8048	.8055
6.4	.8062	.8069	.8075	.8082	.8089	.8096	.8102	.8109	.8116	.8122
6.5	.8129	.8136	.8142	.8149	.8156	.8162	.8169	.8176	.8182	.8189
6.6	.8195	.8202	.8209	.8215	.8222	.8228	.8235	.8241	.8248	.8254
6.7	.8261	.8267	.8274	.8280	.8287	.8293	.8299	.8306	.8312	.8319
6.8	.8325	.8331	.8338	.8344	.8351	.8357	.8363	.8370	.8376	.8382
6.9	.8388	.8395	.8401	.8407	.8414	.8420	.8426	.8432	.8439	.8445
7.0	.8451	.8457	.8463	.8470	.8476	.8482	.8488	.8494	.8500	.8506
7.1	.8513	.8519	.8525	.8531	.8537	.8543	.8549	.8555	.8561	.8567
7.2	.8573	.8579	.8585	.8591	.8597	.8603	.8609	.8615	.8621	.8627
7.3	.8633	.8639	.8645	.8651	.8657	.8663	.8669	.8675	.8681	.8686
7.4	.8692	.8698	.8704	.8710	.8716	.8722	.8727	.8733	.8739	.8745
7.5	.8751	.8756	.8762	.8768	.8774	.8779	.8785	.8791	.8797	.8802
7.6	.8808	.8814	.8820	.8825	.8831	.8837	.8842	.8848	.8854	.8859
7.7	.8865	.8871	.8876	.8882	.8887	.8893	.8899	.8904	.8910	.8915
7.8	.8921	.8927	.8932	.8938	.8943	.8949	.8954	.8960	.8965	.8971
7.9	.8976	.8982	.8987	.8993	.8998	.9004	.9009	.9015	.9020	.9026
8.0	.9031	.9036	.9042	.9047	.9053	.9058	.9063	.9069	.9074	.9079
8.1	.9085	.9090	.9096	.9101	.9106	.9112	.9117	.9122	.9128	.9133
8.2	.9138	.9143	.9149	.9154	.9159	.9165	.9170	.9175	.9180	.9186
8.3	.9191	.9196	.9201	.9206	.9212	.9217	.9222	.9227	.9232	.9238
8.4	.9243	.9248	.9253	.9258	.9263	.9269	.9274	.9279	.9284	.9289
8.5	.9294	.9299	.9304	.9309	.9315	.9320	.9325	.9330	.9335	.9340
8.6	.9345	.9350	.9355	.9360	.9365	.9370	.9375	.9380	.9385	.9390
8.7	.9395	.9400	.9405	.9410	.9415	.9420	.9425	.9430	.9435	.9440
8.8	.9445	.9450	.9455	.9460	.9465	.9469	.9474	.9479	.9484	.9489
8.9	.9494	.9499	.9504	.9509	.9513	.9518	.9523	.9528	.9533	.9538
9.0	.9542	.9547	.9552	.9557	.9562	.9566	.9571	.9576	.9581	.9586
9.1	.9590	.9595	.9600	.9605	.9609	.9614	.9619	.9624	.9628	.9633
9.2	.9638	.9643	.9647	.9652	.9657	.9661	.9666	.9671	.9675	.9680
9.3	.9685	.9689	.9694	.9699	.9703	.9708	.9713	.9717	.9722	.9727
9.4	.9731	.9736	.9741	.9745	.9750	.9754	.9759	.9763	.9768	.9773
9.5	.9777	.9782	.9786	.9791	.9795	.9800	.9805	.9809	.9814	.9818
9.6	.9823	.9827	.9832	.9836	.9841	.9845	.9850	.9854	.9859	.9863
9.7	.9868	.9872	.9877	.9881	.9886	.9890	.9894	.9899	.9903	.9908
9.8	.9912	.9917	.9921	.9926	.9930	.9934	.9939	.9943	.9948	.9952
9.9	.9956	.9961	.9965	.9969	.9974	.9978	.9983	.9987	.9991	.9996

Glossary

A

Absolute	مطلق
Absolute alcohol	كحول مطلق
absorb	يمتص
absorbance	القدرة على امتصاص الضوء
absorptiometry	قياس امتصاص اللون
absorption	امتصاص
absorption curve	منحنى الامتصاص
accelerate	يسرع
accelerator	مسرع
achlorhydria	عدم وجود حامض الهيدركلوريك
acidity	حمضية
active	فعال - نشط
activity	فعالية - نشاط
acute	حاد
adsorb	يمتز - يمص
adsorption	امتزاز وامتصاص
affinity	قابلية
agent	عامل
albumin	آلاح (الالبيومين)
alkaline	قلوي
alkalinity	قلوية
amino acid	حامض اميني
ampholite	امفولايت (يتفاعل كحامض وقلوي)
ampilify	تضخم
anabolic	بناء
anabolism	عملية البناء
anaemia	فقر الدم
anion	سالب
anode	القطب الموجب
anti–diuretic	مانع للادرار
anit–septic	مطهر
aperature	فتحة
aqueous	مائي
arterial	شرياني
artificial	صناعي
ascending	صاعد
atomic	ذري
atomizer	جهاز يكون الرذاذ
automation	تحليل ذاتي او آلي

B

band	شريط - حزمة
base–line	خط الاساس
batch	وجبة
beam	حزمة
bile–acids	احماض الصفراء
bile–pigments	صفات الصفراء
bind	يربط
bond	رابطة آصرة
brain	دماغ - مخ
buffer	محلول منظم - او داری:

C

calcify	يتكلس
calcium	عنصر الكالسيوم
carbohydrates	كربوهيدرات
carcinoma	ورم سرطاني
capacity	سعة
capillary	شعيري
cardiac	قلبي

catabolism	عمليات الهدم	compensate	يعوض
catalyst	عامل مساعد	competitive	منافس
cathode	القطب السالب	complement	متمم
cation	ايون سالب	complex	مركب - معقد
cellular	خلوي	composition	تركيب
centrifuge	جهاز الطرد المركزي	compound	مركب
cerebrospinal fluid	السائل النخاعي	concentration	تركيز
chromatogram	كروماتوجرام	conditions	احوال - ظروف
chromatography	كروماتوجرامي	conjugated	مقترن
chronic	مزمن	conjugation	ترابط
circiut	دائرة	constant	ثابت
citric acid	حامض الستريك	constitution	بنية - تركيب
classification	تصنيف	consumption	استهلاك
cleaning agent	عامل منظف	contamination	تلوث
clearance	تصفية او تنقية	corpuscle	كرية
clinical	سريري	cortex	قشرة
clot	خثرة	counter	عداد
cloudy	متعكر	crystal	بلورة
cloudiness	عكارة	crystalline	بلوري
co-agulate	يتجلط يتخثر	curve	منحنى
co-officient	معامل	cuvette	خلية
co-enzyme	مساعد الانزيم		
collagen	كولاجين - غراء		
colloid	غروي		
colourimeter	جهاز قياس الالوان		
colourimetry	طريقة قياس الالوان		
colour reaction	تفاعل لوني		
column	عمود		
coma	غيبوبة		
combination	اتحاد ادماج		
common	مشترك		
compartment	حيز - مكان		

D

deficiency	نقص
deficient	ناقص
dehydrate	جفاف - نزع الماء
denaturate	يغير طبيعة
denaturation	تغير من طبيعة مادة
density	كثافة
depletion	انتهاء نفاذ
derivative	مشتق
derived lipids	دهون مشتقة
descending	نازل - هابط

detect	يكشف على
detection	الكشف على وجود شيء
detergent	منظف
develop	ينمي
developer	سائل الانماء
development	انماء
diabetes insipidus	البوال التفه
diabetes mellitus	مرض السكر البولي
diabetic	يعود الى مرض السكر
diagnose	يشخص
diagnosis	تشخيص
diagnotic value	ذو فائدة تشخيصية
dialyse	يحمل
dialyser	جهز تحال
dialysis	تحال
diaphragm	حاجز - حجاب
diffuse	ينتشر
diffusion	انتشار
digest	يهضم
digestion	هظم
digestive	هاظم
diluent	مخفف
dilute	يخفف
dilution	تخفيف
direct	مباشر
disaccharide	سكر ثنائي
disease	مرض
disperse	يشتت - يفرق
dispersion	اذابة
dissolution	تفرقة
dissolve	يذيب
dissociation	تفكك - تأين
distill	يقطر
distillate	القطير
distillation	تقطير
distribute	يوزع
distribution	توزيع
drain	يصفي
drift	انحراف
dropwise	اضافة نقطة نقطة
drum	اسطوانة - طبلة
ductless	لا انبوبي
duplicate	مزدوج
dye	صبغة
dystrophy	ضمور

E

ear-lobe	حلمة الاذن
eodema	استسقاء (ورم مائي)
effective	فعالة
egg-white	بياض او زلال البيض
egg-yolk	صفار البيض
elastic	مطاطي
electrode	قطب كهربائي
electrolytes	شوارد
electronic	الكتروني
electron microscope	مجهر الكتروني
electrophoresis	الفصل بالهجرة الكهربائية
elements	عناصر
eluate	محلول الشطف
elute	يشطف
emmission	انبعاث
emulsify	يحول الى مستحلب
emulsification	مستحلب

endocrine	صماء
endogenous	داخلي
endosmosis	تناضح داخلي عكس
end–point	نقطة النهاية في التصحيح
enzyme	انزيم - خميرة
equilibrium	اتزان
erythrocytes	كرية حمراء
ester	استر (ملح عضوي)
ester–phosphorus	الفوسفور الموجود في الاستر
estimate	يقدر
estimation	تقدير
evaporate	يبخر
evaporation	تبخير
exchange	يتبادل
exchange–resin	راتنج تبادلي
excite	يهيج - يحفز
exclude	يقصي
exclusion	اقصاء
excrete	يطرح
excursion	انحراف او شرود
exogenous	خارجي
extracellular	خارج الخلية
extract	يستخلص
extraction	استخلاص
extrinsic factor	عامل خارجي

F

factor	عامل
faeces	براز
fasting	صائم
fatal	مميت
fat–soluble	مذيب للدهون
fatty	دهني
fatty acid	حامض دهني
female	أنثوي
fermentation	تخمر
fibrous	ليفي
filament	خيط
filamentous	خيطي
filtrate	راشح
flame–photometer	مقياس ضوء اللهب
flame–photometry	قياس الضوء في اللهب
flow	مجرى و سريان ، تدفق
fluctuate	يتذبذب
fluctuation	تذبذب
fluoresce	يتفلور - يستشع
fluorescence	فلورة - استشعاع
fluorimetry	القياس بالاستشعاع
fluid therapy	العلاج بالسوائل
foetus	جنين
force	قوة
form	صدرة - نوع
free	حر
freezing	تجميد
front	مقدمة
function	فاعلية - وظيفة
functional	ذو فاعلية
funnel	قمع

G

gall–bile	الحوصلة المرارية
gall–bladder	المثانة
gall–stone	حصوة مرارية
gastric	معدي

hyper مرتفع
hyper–tension ضغط مرتفع
hypertonic فرط التوتر او الضغط
hypertrophy تضخم
hypo منخفض
hypotonic منخفض التوتر او الضغط

I

immune مناعي
immuno–electrophoresis فصل كهربائي مناعي
immunoglobulins جلوبيولينات مناعية
immunology علم المناعة
inactive غير نشط
incubate يحضن
incubation تحضين
indefinitely الى ما لا نهاية
indicator مؤشر - دليل
indigestion سوء هضم
indirect غير مباشر
infarction احتشاء
infectious معدي
infra–red ray اشعة تحت الحمراء
inhibition تثبيط
inhibitor مثبط
intermediate وسط
interruption اعاقة
intestinal معوي
intracellular داخل الخلية
intrinsic factor عامل داخلي
inversion قلب من اعلي الى اسفل
invert iodine number رقم اليود
ion–exchange تبادل ايوني

gene جين - حامل الصفة الوراثية
genetic وراثي
gingivitis التهاب اللثة
globular كروي
globulin جلوبيولين
glycogen الجليكوجين
glycolipid دهني سكري
goiter تضخم الغدة الدرقية
gout داء النقرس
gradient تدرج
graduated مدرج
gravity جاذبية
grease شحم
ground–tissue انسجة مطحونة
growth hormone هرمون النمو
gum اللثة

H

haemochromatosis صباغ دموي
haemolysis تحلل الدم
haemorrhage نزيف
haemosiderosis تحال الدم
heart القلب
hepatic كبدي
hepatitis التهاب الكبد
hereditary وراثي
heterogenous غير متجانس
homogenous متجانس
hormone هرمون
hydrated مميء
hydration تموه
hydrolysis تحلل مائي

ionic ايوني
ionic strength القوة الآيونية
iso–electric point نقطة توازي كهربائي
isolate يفصل
isolation فصل
isotonic متساو التوتر او الضغط

J

jaundice يرقان
joint مفصل
juice عصارة - عصير
junction نقطة اتصال
junction–surface السطح عند اتصال سائلين

K

keto–acid حامض كيتوني
ketone bodies اجسام كيتونية
ketosis وجود اجسام كيتونية في الدم
kidney الكلية

L

labile غير ثابت - غير مستقر
lacking (of red cells) تكسير - تحلل
law قانون
leucocyte كرية بيضاء
liberate يحرر
light filter مرشح ضوئي
linear مستقيمي
lipids دهون
lipoprotein بروتين دهني
liquid سائل
liver الكبد
lubricant شحم - دهني
lubricate يشحم
lubrication تشحيم
lung الرئة
lymph الليمف
lymphatic ليمفاوي

M

male ذكر
mammals الثدييات
maximum الحد الاقصى او الاعلى
medium وسط
medulla لب
mellituria ظهور السكر في البول
membrane غشاء
metabolic alkalosis قلاء الايض
metabolism ايض - تمثيل
migrate طريقة method يهاجر - ينتقل
migration – milli هجرة - انتقال
minimum الحد الادنى
mobile متحرك
mobile–phase الوسط المتحرك
mobility تحرك - حركة
molecular جزيئي
monochromatic احادي اللون
monosaccharide سكر احادي
mucin بروتين مخاطي (ميوسين)
mucous مخاط - مخاطي
muscle عضلة
muscular عضلي
myelomatosis الورام النخاعي
myocardiac عضلة القلب
myxedema الخزب المخاطي

N

natural	طبيعي
nephelometry	القياس بالتكدر
nephritis	التهاب الكلية
nephrotic	متلازمة الكلية
nerve	عصب
neurological	عصبي (يعود للاعصاب)
neutral	متعادل
newborn	حديث الولادة
normal	طبيعي - عياري
normal solution	محلول عياري
nucleic acid	حامض نووي
nucleoprotein	بروتين نووي
nutrition	تغذية
nutritional	غذائي

O

obstruct	يسد
obstruction	انسداد
obstructive jaundice	يرقان انسدادي
occult blood	دم خفي
oil	زيت
oliguria	قلة التبول
optical	ضوئي
optical density	كثافة ضوئية
osmotic pressure	الضغط الازموزي
osteomalacia	لين العظام
ovary	مبيض
oxidase	انزيم مؤكسد
oxidation	تأكسد
oxidize	يؤكسد

P

pancreas	البنكرياس
pancreatic	يعود الى البنكرياس
pancreatic amylase	اميليز البنكرياس
paralysis	شلل
parathyriod	جنب درقي
particles	حبيبات
partition	توزيع
partition chromatochraphy	الفصل الكروماتوجرافي التوزيعي
paste	عجينة
pathological	مرضي
peristaltic movement	حركة دورية
permeable	نفاذ
pernicious anaemia	فقر الدم الخبيث
phase	وسط
phenomenonn	ظاهرة
phospholipids	دهون فوسفورية
photocell	خلية ضوئية
physiological	فسيولوجي
pituitary gland	الغدة النخامية
pipette	ماصة
placenta	المشيمة
plasma	البلازما
platelets	الصفائح الدموية
polysaccharide	سكر عديد
polyuria	فرط التبول
pooled serum	مصل دم متجمع من عدة نماذج
precursor	مادة ينتج منها مادة اخرى
pregnancy	الحمل
prepare	يجهز - يحضر
preserve	يحفظ
preservative	مادة حافظة
pressure	ضغط
prevent	يمنع
primary	اولى
prism	منشور

prognosis	توقع تطور المرض
product	منتج
property	صفة ـ خاصة
protein	بروتين
protective	واق
prothrombin	منشىء الليفين
psychic factors	عوامل نفسية
purification	تنقية
purify	ينقي
putrifaction	تعفن
pyloric stenosis	تضيق البواب

Q

qualitative	نوعي
quantitive	كمي

R

rachitic	صفة الكساح
race	سلالة عرق
range	مدى
rate	سرعة
reagent	كاشف
reaction	تفاعل
record	يسجل
recovery	استرداد
reduce	يختزل
reduction	اختزال
reflux	مسترجع
regulate	ينظم
regulation	تنظيم
residue	بقايا ـ يواقي
resin	راتنج
respiratory	تنفسي
retina	شبكية العين
reversible	عكسي
rheumatic	روماتزمي
rheumatoid	شبيه الروماتزم
ricket	الكساح
ring	حلقة
rod	قضيب
rotation	دوران

S

saliva	لعاب
salivary	لعابي
salt-bridge	جسر ملحي
salting out	الترسيب بالاملاح
sample	نموذج ـ عينة
saponification	تصبن
saturated	مشبع
scale	مقياس ـ تدرج
secondary	ثانوي
secretion	يفرز
secrete	افراز
sediment	راسب
select	يختار ـ ينتقي
selection	اختيار ـ انتقاء
selective	اختياري ـ انتقائي
sensitive	حساس ـ ذو دقة
sensitivity	حساسية ـ دقة
separate	يفصل
separation	فصل
serum	مصل
sex	جنس
sexual	جنسي
sheath	غلاف
simple	بسيط

simulaneous	في نفس الوقت
skeletal	هيكلي
skeletal muscles	عضلات هيكلية
slit	فتحة
smooth	املس - سهل
solid	صلب
soluble	قابل للذوبان
solubility	درجة الذوبان
solute	مذاب
solvent	مذيب
solution	محلول
solution	محلول
space	حيز . فراغ ، مكان محدد
specific	نوعي - خاص
specific activity	فاعلية او نشاط نوعي
specific gravity	كثافة نوعية
specimen	نموذج - عينة
spectrum	طيف
spherical	دائري - كروي
stain	صبغة
standard	قياسي
standard curve	منحنى قياسي
standard solution	محلول قياسي
state	حالة
stationary	ثابت - مستقر
sterile	معقم
stock	مخزون
stomach	معدة
stools	براز
storage	تخزين
strip	شريط
structure	تركيب
subclinical	تحت سريري
substrate	المادة الاساس (الخلية)
successive	متتابع - متوالي
suitable	مناسب
supernatant	السائل العلوي الرائق
support	دعامة - عماد
survey	مسح
suspend	يعلق
suspesion	معلق
sweat	عرق
swellin	ينتفخ
symbol	رمز
syndrome	متلازمة
synovial fluid	السائل المزلق
synthesis	تكوين
syring	حقنة
system	جهاز

T

teat	حلمة
tension	جهد - شد
terminal	طرفي - نهائي
test	اختبار
testis	خصية
tetany	التكزز
theory	نظرية
thermostat	منظم حراري
thyroid	درقي
thyroid gland	الغدة الدرقية
thyrotoxicosis	تسمم درقي
titrate	يسحح - يعادل
titration	تسحيح - معايرة
tolerance curve	منحنى التحمل
tract	مجرى
transfer	ينقل
transport	يحمل
triglyceride	ثلاثي الجليسريد

wetting agent مادة مبللة

X

xanthomatosis الورام الاصفر

xerophthalmia جفاف مقلة العين

Z

zinc الزنك (الخارصين)

zone منطقة

zone–electopgoresis فصل كهربائي محدد المناطق

zwitterion ثنائي الايون

turbidity عكارة

U

ulcer قرحة

ulcerative متقرح

ultra فائق ـ فوق

ultra–centrifuge جهاز فصل دوار فائق السرعة

ultraviolet rays اشعة فوق بنفسجية

uncongugated غير مقترن

uniform موحد

unit وحدة

unsaturated غير مشبع

unstable غير ثابت

urea يوريا

uremia زيادة اليوريا في الدم ـ بولينا

uric acid حامض اليوريك

urine بول

V

vaccuum فراغ

valve صمام

vapour بخار

variation اختلاف

velocity سرعة

venous وريدي

viscosity لزوجة

visible مرئي

vitamin فيتامين

volatile متطاير

volume حجم

volumetric حجمي

W

warfare–gases غازات الحروب السامة

wave موجة

wavelenght طول الموجة

References المراجع العلمية

1) - Todd - Stanford Clinical Diagnosis by laboratory methods By: Davidsohn, I and Henry, J.B.
Published by : Saunder's Co, Ltd., Philadelphia.

2) - Clinical Chemistry (Fourth edition).
By: Joseph , S.Annino and Roger, W.Giese.
Published by: Littel - Brown and Co.,Boston, 1976.

3) - Micro - analysis on - Medical Biochemistry.
By : Wootton, I.D.P.
Published by: J and AChurchill Ltd.London. 1970.

4) - Fundamentals of clinical chemistry
By : Tietz, N.W.
Published by : Saunders Co., Philadelphia, 1970.
By : Tietz, N. W.
Published by: Saunders Co., Philadelphia, 1970.

5) - Practical Clinical Biochemistry.
By :
Varely, H.
Published by: Interscience, New York, 1976.

6) - Standard methods of clinical chemistry (volumes 1–8).
Published by: Academic Press, New York, USA.

الفهرس

الفهرس

الفهرس

رقم الايداع في المكتبة الوطنية ١٣٦٣/١٩٨٠